

# Eine Frage der Form: Mechanismen morphologischer Differenzierung in Bakterien

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt

von

Diplomhumanbiologin

**Juliane Kühn**

aus Erfurt

Marburg(Lahn), Juni 2010

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg (Hochschulkennziffer: 1180)  
als Dissertation angenommen am 20.09.2010

Erstgutachter: Jun.-Prof. Dr. Martin Thanbichler  
Zweitgutachter: Prof. Dr. Erhard Bremer

Tag der mündlichen Prüfung: 20.09.2010

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Mai 2007 bis Juni 2010 am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie unter der Leitung von Jun.-Prof. Dr. Martin Thanbichler durchgeführt.

Die während der Promotion erzielten Ergebnisse wurden in folgender Originalpublikation veröffentlicht:

J. Kühn, A. Briegel, E. Mörschel, J. Kahnt, K. Leser, S. Wick, G. J. Jensen, M. Thanbichler. (2010). „Bactofilins, a ubiquitous class of cytoskeletal proteins mediating polar localization of a cell wall synthase in *Caulobacter crescentus*.“ EMBO J **29**(2): 327-339.



# Abstract

Prokaryotes have evolved a diversity of cell shapes and lifestyles, but the mechanisms that underlie this variety are largely unknown. There are two major determinants controlling the morphology of bacteria. The cytoskeleton plays a key role in the temporal and spatial organisation of the prokaryotic cell and thus defines the appearance of the organism, whereas the cell envelope, composed of peptidoglycan, protects the cell from lysis due to pressure differences and helps to maintain its shape.

In this study a new class of polymer-forming proteins, termed bactofilins, was identified. Proteins belonging to this group are widely conserved among bacteria. In the dimorphic bacterium *Caulobacter crescentus*, the two bactofilin paralogues BacA and BacB cooperate to form a sheet-like structure lining the cytoplasmic membrane in proximity of the stalked cell pole. These assemblies mediate polar localization of a peptidoglycan synthase involved in stalk morphogenesis, thus complementing the function of the actin-like cytoskeleton and the cell division machinery in the regulation of the cell wall biogenesis. In other bacteria, bactofilins can establish rod-shaped filaments or associate with the cell division apparatus indicating considerable structural and functional flexibility. All bactofilins investigated so far polymerize spontaneously in the absence of additional cofactors *in vitro*, forming stable filament bundles. These results suggest that the observed structures have evolved as an alternative to intermediate filaments, serving as versatile molecular scaffolds in a variety of cellular pathways.

During phosphate starvation *C. crescentus* cells transiently change their shape. The most prominent feature of this differentiation process is a dramatic elongation of the stalk to produce appendages as much as 30 times longer than those of cells growing in phosphate-rich medium. Using microarray analysis, the response of cells to a limitation of phosphate was examined in more detail. This study revealed many similarities to the well-characterized reaction of *E. coli* and identified putative members of the Pho-regulon in *C. crescentus*, including genes that encode enzymes such as phosphatases and endonucleases. In addition, the so far poorly investigated type II secretion system of this organism was induced under phosphate starvation. This observation is consistent with the increased expression of genes involved in the release of phosphate from organic compounds that cannot be imported into the cell due to size limitations. The transport of the respective enzymes to the cell surface may be a possibility to capture phosphate from sources that are otherwise not accessible. The putative lipoprotein CC0170 is associated with the type II secretion systems and may act as a chaperon for parts of the secretion machinery or for some transported compounds. The transcriptional profiling revealed that *bacA* is up-regulated during phosphate limitation. Deletion of this gene leads to short stalks in phosphate-low media. Thus, elongation of the stalk under these conditions seems to be particularly dependent on bactofilins, suggesting an key role of these proteins in cellular differentiation.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Die Determination der bakteriellen Zellform . . . . .	1
1.1.1	Klassische Zytoskelettelemente . . . . .	3
1.1.2	Akzessorische Proteine . . . . .	6
1.1.3	Die Peptidoglykansynthese . . . . .	6
1.2	Die verschiedenen Gesichter des <i>Caulobacter crescentus</i> . . . . .	10
1.2.1	Morphologische Veränderungen im Verlauf des Zellzyklus . . . . .	10
1.2.2	Kontrolle der Zellform bei Nährstofflimitierung . . . . .	13
1.3	Rahmen der Arbeit . . . . .	16
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>17</b>
2.1	Materialien . . . . .	17
2.1.1	Chemikalien . . . . .	17
2.1.2	Puffer und Lösungen . . . . .	17
2.1.3	Medien . . . . .	17
2.1.4	Oligonukleotide . . . . .	19
2.1.5	Plasmide . . . . .	19
2.1.6	Stämme . . . . .	20
2.2	Mikrobiologische und zellbiologische Methoden . . . . .	20
2.2.1	Kultivierung . . . . .	20
2.2.2	Lagerung der Stämme . . . . .	21
2.2.3	Schwärm-Platten . . . . .	21
2.2.4	Synchronisation . . . . .	21
2.2.5	Mikroskopische Methoden . . . . .	22
2.3	Molekularbiologische Methoden . . . . .	23
2.3.1	Konstruktion der Plasmide . . . . .	23
2.3.2	DNA-Präparation aus Bakterienzellen . . . . .	25
2.3.3	DNA-Sequenzierung . . . . .	25
2.3.4	Polymerasekettenreaktion . . . . .	25
2.3.5	Agarosegelelektrophorese . . . . .	26
2.3.6	Restriktion und Ligation von DNA-Fragmenten . . . . .	26
2.3.7	Herstellen chemisch kompetenter <i>E. coli</i> . . . . .	27
2.3.8	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> . . . . .	27
2.3.9	Herstellen elektrokompenter <i>C. crescentus</i> . . . . .	27
2.3.10	Transformation elektrokompenter <i>C. crescentus</i> . . . . .	27

2.3.11	Transduktion von <i>C. crescentus</i> . . . . .	28
2.3.12	Transformation elektrokompenter <i>M. xanthus</i> . . . . .	29
2.3.13	Transformation von <i>S. oneidensis</i> über Konjugation . . . . .	29
2.3.14	RNA-Präparation aus <i>C. crescentus</i> . . . . .	30
2.3.15	Microarray . . . . .	31
2.3.16	Bestimmung der Promotoraktivität mittels $\beta$ -Galactosidase-Assay . . . . .	32
2.4	Biochemische Methoden . . . . .	32
2.4.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese . . . . .	32
2.4.2	Färben von SDS-Gelen . . . . .	33
2.4.3	Western Blot . . . . .	34
2.4.4	Zellfraktionierung . . . . .	34
2.4.5	Anreicherung von Proteinen aus dem Überstand einer Suspensionskultur . . . . .	35
2.4.6	Isolation von Membranvesikeln aus dem Kulturüberstand . . . . .	35
2.4.7	Heterologe Überexpression in <i>E. coli</i> . . . . .	36
2.4.8	Proteinaufreinigung . . . . .	36
2.4.9	Sedimentationstest . . . . .	38
2.4.10	Co-Immunpräzipitation und Massenspektrometrie . . . . .	38
2.5	Bioinformatische Methoden . . . . .	39
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>41</b>
3.1	Charakterisierung Polymer-bildender Proteine in Bakterien . . . . .	41
3.1.1	Identifikation und Lokalisation von Bactofilin-Homologen in <i>C. crescentus</i> . . . . .	41
3.1.2	Bactofiline bilden Membran-assoziierte polymere Strukturen . . . . .	44
3.1.3	BacA und BacB polymerisieren <i>in vitro</i> ohne Zusatz von Co-Faktoren . . . . .	48
3.1.4	Bactofiline interagieren miteinander und vermitteln die Lokalisation einer Peptidoglykansynthase . . . . .	50
3.1.5	Bactofilin-Homologe sind weit verbreitet unter Bakterien . . . . .	54
3.2	Phosphatlimitierung in <i>C. crescentus</i> . . . . .	60
3.2.1	Regulation der Transkription als Antwort auf Phosphatmangel . . . . .	60
3.2.2	Identifikation von Genen des Pho-Regulon in <i>C. crescentus</i> . . . . .	66
3.2.3	In <i>C. crescentus</i> wird die Transkriptionsregulation unter Phosphatmangel zusätzlich durch ein MarR-ähnliches Protein moduliert . . . . .	68
3.2.4	Das Typ II-Sekretionssystem und damit assoziierte Gene aus <i>C. crescentus</i> werden unter Phosphatmangel induziert . . . . .	71
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>79</b>
4.1	Bactofiline sind eine neue Gruppe von Zytoskelettelementen . . . . .	79
4.1.1	Die Funktion der Bactofiline . . . . .	80
4.1.2	Die Polymerisation von Bactofilinen . . . . .	83
4.2	Transkriptionsregulation als Antwort auf eine Verknappung von Nährstoffen . . . . .	86
4.2.1	Steuerung der Antwort auf Phosphatmangel durch PhoB und CC3677 . . . . .	87
4.2.2	Die Funktion von Typ II-Sekretionssystemen . . . . .	89
4.3	Schlussfolgerung und Ausblick . . . . .	92



<b>5</b>	<b>Appendix</b>	<b>95</b>
5.1	Auflistung der verwendeten Oligonukleotide, Plasmide und Stämme . . . . .	95
5.2	Unter Phosphatmangel regulierte Gene . . . . .	102
5.3	Matrix für die Suche nach Pho-Boxen mittels FIMO . . . . .	118



# 1 Einleitung

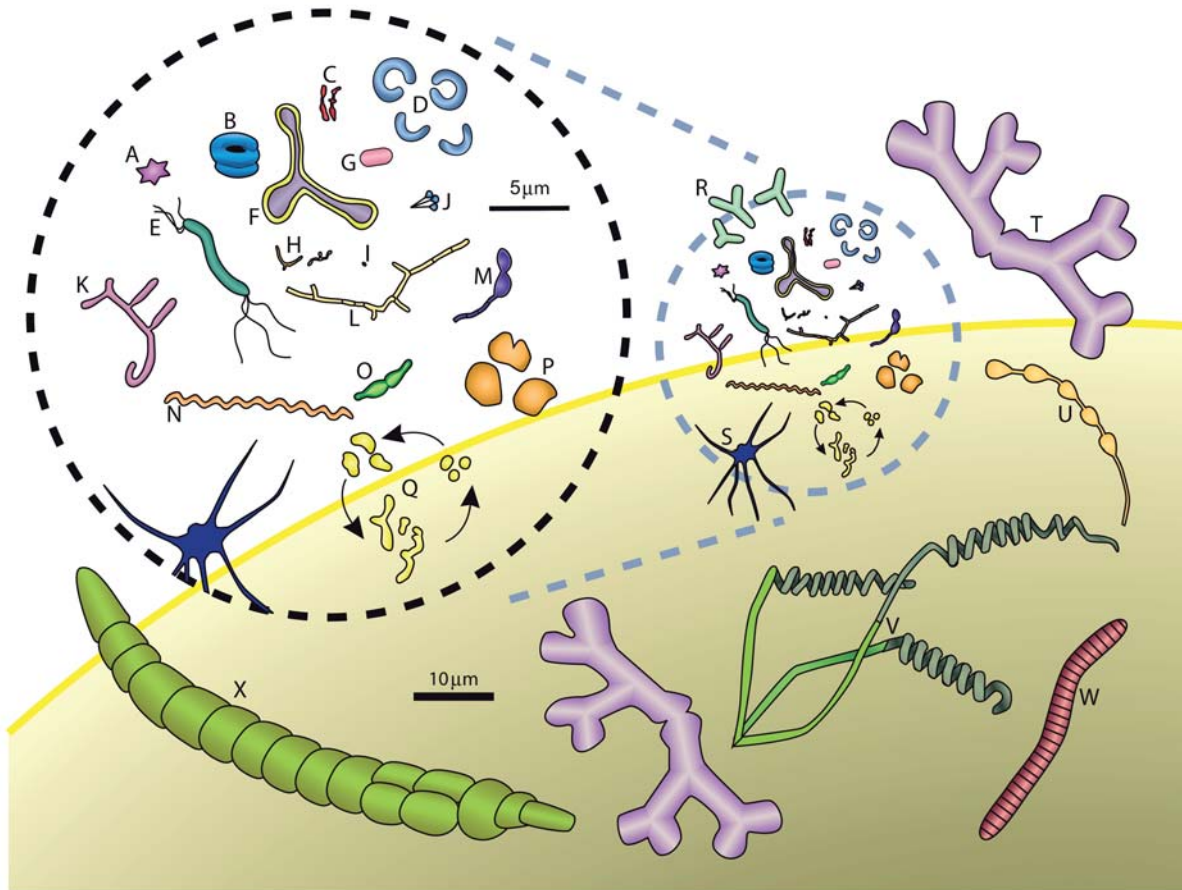
Das Reich der Bakterien ist morphologisch betrachtet durch eine enorme Vielfalt geprägt. Unterstrichen wird dies durch das vorhandene Spektrum an Größen - vom winzigen *Pelagibacter ubique* mit einem Volumen von  $0.01 \mu\text{m}^3$  [146] bis zu Riesen wie *Thiomargarita namibiensis* und *Epulopiscium fishelsoni* mit  $10^8$  bis  $10^{10}$ -fach größeren Volumina [156]. Aber auch die einzelnen Zellformen lassen sich nicht auf Stäbchen, Kokken und Spirillen reduzieren (siehe Abbildung 1.1), und selbst vielzellige Gebilde, wie die durch *Streptomyces*-Arten gebildeten pilzmycelähnlichen Strukturen, sind weit verbreitet. Dabei ist die Form einer Bakterienzelle nicht starr, sondern kann temporär in Folge von Wachstumsphasen, veränderter Nährstoffzufuhr oder Anpassung an einen Wirtsorganismus geändert werden. Auch in Folge der Entwicklung zu spezialisierten Zellstrukturen wie Sporen, Heterocysten oder multizellulären Einheiten (zum Beispiel Fruchtkörper) kann die Morphologie von Bakterien variiert werden.

Aber warum existieren so viele unterschiedliche Formen? Hierfür werden vor allem der Selektionsdruck und die vorherrschenden physikalische Bedingungen verantwortlich gemacht. Unterschiedliche Formen können einen Einfluss auf die Effizienz der Substrataufnahme (siehe Abschnitt 1.2.2), aber auch auf die Beweglichkeit des Organismus oder den Schutz gegenüber Fressfeinden haben [92]. Auf der anderen Seite ist jede Zelle den physikalischen Gesetzen unterworfen. So kann die Größe einer Bakterienzelle zum Beispiel ein bestimmtes Maß nicht überschreiten, wenn keine intrazellulären Transportmechanismen zur Verfügung stehen (Diffusionslimitierung) [199].

Aufgrund ihrer relativen Einfachheit und der meist geringen Größe ging man lange Zeit vom Fehlen strukturierender Einheiten oder einer Form von Kompartimentalisierung in Prokaryoten aus - die typische Bakterienzelle wurde als eine Art kleiner Beutel angesehen, in den alles Wichtige „lose hineingeworfen“ wurde [199]. Erst in den letzten Jahren konnten Mechanismen identifiziert werden, die an der Bestimmung der bakteriellen Zellform beteiligt sind. So konnte in den 1990ern, also 60 Jahre nachdem Wintrebert den Begriff Zytoskelett prägte [60], für das bakterielle Zellteilungsprotein FtsZ eine strukturbildende Rolle in *Escherichia coli* nachgewiesen werden [39, 147].

## 1.1 Die Determination der bakteriellen Zellform

Fast alle Bakterien sind von einer Zellwand, das heißt einer relativ starren Hülle, gebildet vor allem aus Peptidoglykan (dem sogenannten Murein-Sacculus), umgeben. Dieses Makromolekül umschließt die Zelle wie ein Netz und wirkt aufgrund der steifen Konsistenz dem hohen intrazellulären Druck (Turgor) entgegen. Die zwei Klassen von bakteriellen Zellwänden werden über die Dicke der Peptidoglykanschicht definiert. Gram-positive Zellwände bestehen aus



**Abbildung 1.1:** Die Vielfalt prokaryotischer Zellformen. A) *Stella* strain IFAM1312; B) *Ancylobacter fl vus*; C) *Bifidobacterium bifidum*; D) *Clostridium cocleatum*; E) *Aquaspirillum autotrophicum*; F) *Pyroditium abyssii*; G) *Escherichia coli*; H) *Bifidobacterium* sp.; I) Querschnitt eines Bakteriums, welches mit der *ratoon stunt disease* des Zuckerrohrs in Verbindung gebracht wird; J) *Planctomyces* sp.; K) *Nocardia opaca*; L) Kette von *ratoon stunt*-assoziierten Bakterien; M) *Caulobacter* sp.; N) *Spirochaeta halophila*; O) *Prostheobacter fusiformis*; P) *Methanogenium cariaci*; Q) *Arthrobacter globiformis* Wachstumszyklus; R) Gram-negative  $\alpha$ -Proteobacteria aus marinen Schwämmen; S) *Ancalomicrobium* sp.; T) *Nevskia ramosa*; U) *Rhodomicrobium vanniellii*; V) *Streptomyces* sp.; W) *Caryophanon latum*; X) *Calothrix* sp. Die gelb-umrandete Halbkugel im Hintergrund repräsentiert einen Schnitt durch das Riesebakterium *Thiomargarita namibiensis*, abgebildet mit der gleichen Skalierung wie die Organismen T bis X. Abbildung entnommen aus [199].

mehreren Schichten Peptidoglykan (20 bis 80 nm im Durchmesser) und können gut mit Hilfe des Farbstoffs Kristallviolett visualisiert werden [69]. Ist dagegen nur eine dünne Schicht Peptidoglykan vorhanden (1 bis 7 nm) lassen sich die Zellen nicht mit Kristallviolett anfärben und werden als Gram-negativ bezeichnet. Gram-negative Zellen besitzen eine äußere Zellmembran, die ein zusätzliches Kompartiment - das Periplasma - von der Außenwelt abtrennt. Die äußere Membran und die Peptidoglykanschicht sind über Lipoproteine miteinander verbunden.

Eine einmal durch das Zytoskelett definierte Form wird mit Hilfe der Zellwand aufrecht erhalten und geschützt, was den Vergleich von Zellwand und Zytoskelett mit Haut und Knochen nahe legt [28]. Soll die Form nun verändert werden (sei es im Zuge des Zellwachstums oder für globale Veränderungen der Zellmorphologie), muss der Murein-Sacculus modifiziert werden. Dies wird über spezielle Enzyme (Peptidoglykan-hydrolysierende und -synthetisierende Protei-

ne, siehe Abschnitt 1.1.3) reguliert, welche wiederum mit Hilfe des Zytoskeletts zu festgelegten Bereichen der Zellhülle rekrutiert werden. Hierbei kann man zwei Arten des Wachstums unterscheiden: Runde Zelltypen (Kokken) wachsen vor allem durch Synthese der Zellwand im Verlauf der Zellteilung, während bei stäbchenförmigen Bakterien zwischen einer Verlängerung des Zylinders zur Vergrößerung der Zelllänge und einer bei der Teilung auftretenden Zellwandsynthese unterschieden werden kann. Die Rekrutierung der Zellwandbiosynthese-Enzyme erfolgt abhängig vom Wachstumsmodus durch verschiedene Zytoskelettelemente.

### 1.1.1 Klassische Zytoskelettelemente

Das Zytoskelett ist ein integraler Bestandteil der Zelle und steuert die räumliche und zeitliche Organisation von biologischen Prozessen. Es besteht aus einem dynamischen Netzwerk aus Protein-Filamenten im Zytoplasma, die als Gerüst für die strukturelle Unterstützung der Zelle (Definition der Zellform) und zur Rekrutierung von makromolekularen Komplexen zu festgelegten subzellulären Bereichen dienen. In den letzten Jahren wurden verschiedene Polymer-bildende Proteine in Bakterien identifiziert und ihre Rolle für die Zellpolarität, Morphogenese, DNA-Segregation und Zellteilung nachgewiesen. Einige Vertreter dieser Gruppe von Proteinen - wie das essentielle Zellteilungsprotein FtsZ - sind in fast allen Bakterienspezies zu finden [180], andere scheinen nur in einer bestimmten Auswahl von Organismen konserviert zu sein [70, 132]. Einen Überblick der klassischen, das heißt in Analogie zu eukaryotischen Systemen stehenden, Zytoskelettelemente in Bakterien bietet Abbildung 1.2.

Das Protein FtsZ ist homolog zum eukaryotischen Tubulin, welches sich zu langen Röhren (den sogenannten Mikrotubuli) in der Zelle zusammenlagert. Ebenso wie Tubulin ist FtsZ in der Lage, Guanosintriphosphat (GTP) zu binden und zu hydrolysieren [23]. Nach Bindung von GTP polymerisiert FtsZ zu geraden Strukturen, die bei Hydrolyse des GTP zu Guanosindiphosphat (GDP) eine gebogene Form annehmen [126, 116]. FtsZ lagert sich in der späteren Teilungsebene zu einem ringförmigen Komplex (dem sogenannten Z-Ring) zusammen und dient als Plattform für den Zusammenbau des Zellteilungsapparats [19, 65]. Mehrere aktuelle Arbeiten legen nahe, dass der dynamische Umbau dieser Struktur die treibende Kraft für die Zytokinese von Bakterienzellen darstellt [112, 129]. Der Zellteilungsapparat (auch als Divisom bezeichnet) beinhaltet Murein-hydrolysierende und -synthetisierende Enzyme und kann so den für die Zellteilung essentiellen Aufbruch der Peptidoglykanschicht und die Synthese von Zellwandkomponenten zur Ausbildung der neuen Pole koordinieren. In *Caulobacter crescentus* konnte gezeigt werden, dass FtsZ zudem an der Zellverlängerung beteiligt ist, da es schon lange vor der Kontraktion des Z-Rings einen Komplex aus Enzymen zur Peptidoglykansynthese zur Zellmitte lokalisiert und somit für das mediale Zellwandwachstum vor Beginn der Zellteilung verantwortlich ist [1]. Dies steht in Einklang mit der Hypothese, dass FtsZ unabhängig von der Ausbildung des Z-Rings auch Bestandteil eines hoch-dynamischen helikalen Zytoskeletts ist, welches entlang der Längsachse der Zelle oszilliert [172].

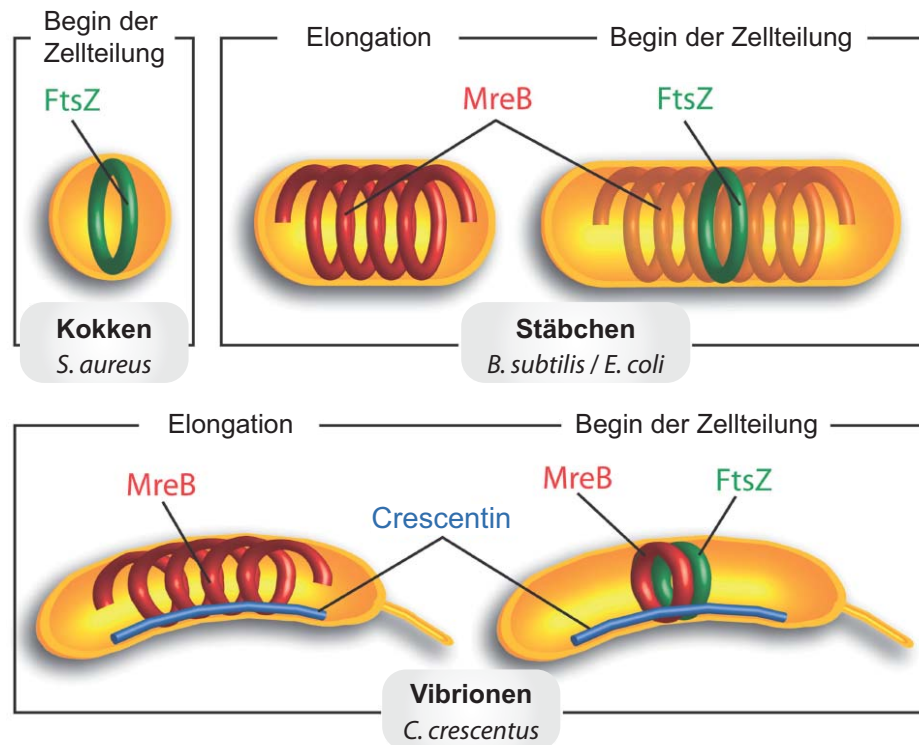
In vielen stäbchenförmigen Bakterien wird die generelle Zellmorphologie durch ein weiteres Zytoskelett-Element organisiert, welches eine Homologie zu dem aus Eukaryoten bekannten Aktin aufweist. MreB und dessen verschiedenen Paraloge (zum Beispiel Mbl und MreBH in *Bacillus subtilis* [29]) bilden helikale Strukturen, die an der Zytoplasmamembran entlang

verlaufen und, ähnlich wie FtsZ, die räumliche Verteilung von Zellwandbiosynthese-Enzymen kontrollieren [192]. Das Vorhandensein von MreB-Polymeren in der Zelle ist dabei essentiell für die Ausbildung der Stäbchenform, da das Zerstören dieser Strukturen durch die Einwirkung von Inhibitoren wie der Verbindung A22 dazu führt, dass die Zellen ihre charakteristische Form verlieren und sich abrunden [87, 64]. Außerdem konnte kürzlich gezeigt werden, dass nach einem Auswaschen der entsprechenden Inhibitoren die runden Zellen in Abhängigkeit von MreB wieder ihre ursprüngliche Stäbchenform ausbilden können [169]. Ähnlich wie bei den durch FtsZ gebildeten Strukturen verhalten sich MreB-Polymere sehr dynamisch in der Zelle, was durch Fusionen an fluoreszierende Proteine gezeigt werden konnte [30]. Die Polymerisation von MreB ist abhängig von Nukleotid-Cofaktoren, wobei hier im Gegensatz zum Polymerisationsverhalten von Aktin Adenosintriphosphat (ATP) auch durch GTP ersetzt werden kann [55]. In *E. coli* und *C. crescentus* konnte demonstriert werden, dass die durch MreB gebildete Helix während der Zellteilung kollabiert und zwei um den Z-Ring angeordnete, ringförmige Strukturen ausbildet. So wird die Peptidoglykansynthese zu diesem Zeitpunkt auf die Zellmitte beschränkt und eine gleichmäßige Verteilung des MreB-Zytoskeletts auf die beiden Tochterzellen garantiert [179, 48]. Neben der Abhängigkeit vom Zellzyklus ist dieser Prozess auch gebunden an das Vorhandensein des Zytoskelettelements FtsZ [57]. In Übereinstimmung damit wurde kürzlich eine Interaktion von MreB und FtsZ postuliert [192]. Neben der Koordination der Zellwandbiosynthese sind MreB und seine Homologe möglicherweise auch an der Chromosomensegregation und der Bestimmung der Zellpolarität beteiligt [91, 29]. So ist MreB zum Beispiel in *C. crescentus* in die Lokalisation von Proteinen wie PleC, DivJ und CckA zum Pol involviert [63]. Diese Proteine sind Teil von Signaltransduktionskaskaden, die über den Transkriptionsregulator CtrA den Verlauf des Zellzyklus steuern.

Eine dritte Klasse von Faktoren, die die Morphogenese von Bakterien beeinflussen, sind die Intermediärfilament-artigen Proteine [8, 13]. Das am besten charakterisierte Mitglied dieser Gruppe - Crescentin - polymerisiert zu einer Struktur, die in der inneren Biegung von *C. crescentus*-Zellen lokalisiert und für die typische gebogene Form dieses Bakteriums verantwortlich ist. Eine Deletion des entsprechenden Gens resultiert in Zellen mit gerader Stäbchenform [8], während eine erhöhte Produktion von Crescentin zu Zellen mit einer stärker ausgeprägten Krümmung führt [27]. Beides, ein Fehlen oder ein Übermaß des Proteins, zeigt aber keinen Einfluss auf die Vitalität der Bakterien. Im Gegensatz zu MreB, welches an der Rekrutierung von Zellwandbiosynthese-Enzymen zu bestimmten Bereichen lateral der Zellhülle beteiligt ist, wirkt die von Crescentin gebildete Struktur durch mechanische Kraftausübung auf das Längenwachstum der Zellwand. Dies führt indirekt zu einer ungleichmäßigen Peptidoglykansynthese an den beiden Längsseiten der Zelle und somit zur Biegung [27]. Dabei scheinen die Crescentin-Polymere in der inneren Biegung der Zelle federartig aufgespannt zu sein, da ein Lösen dieser Filamente durch Schwächung der Zellwand zu deren Kollabieren in eine helikale Form führt. Die Intermediärfilament-ähnlichen Proteine können im Gegensatz zu FtsZ und MreB spontan und ohne Cofaktoren polymerisieren und *in vivo* und *in vitro* flexible, aber im Vergleich weniger dynamische Filamente ausbilden [8, 13, 32].

Neben den klassischen Zytoskelettelementen besitzen viele Bakterien Proteine, die zu membran-assoziierten Gittern polymerisieren und als Gerüst für den Zusammenbau oder





**Abbildung 1.2:** Schematische Darstellung der klassischen Zytoskelettelemente in Bakterien. Das Tubulin-ähnliche Protein FtsZ (in Grün) ist das einzig bekannte Zytoskelettelement in sphärischen Bakterien. Es lokalisiert dort, aber auch in stäbchenförmigen und vibrioiden Zelltypen als ein Ring in der Teilungsebene und rekrutiert andere Zellteilungsproteine. Die meisten stäbchenförmigen und vibrioiden Bakterien besitzen zusätzlich das Aktin-Homolog MreB (in Rot). Dieses Protein bildet eine Helix-artige Struktur entlang der Zellmembran und ist für das Längenwachstum essentiell. Intermediärfilament-ähnliche Proteine wie Crescentin (in Blau) wurden bisher nur in wenigen Spezies nachgewiesen. In *C. crescentus* sorgt dieses Protein für die Biegung der Zellen. Abbildung modifiziert nach [28].

die Lokalisation von anderen Proteinen oder Proteinkomplexen sorgen [163, 22]. Ein Beispiel für ein solches Protein ist DivIVA aus *B. subtilis*, das dort an den Zellpolen und in der Teilungsebene lokalisiert und als Rekrutierungsfaktor für den Zellteilungsregulator MinCD agiert [50]. Außerdem interagiert DivIVA während der Sporulation mit dem DNA-bindenden Protein RacA und führt so zur Verankerung des chromosomalen Replikationsursprungs am Pol [16, 195]. In Actinomyceten dagegen fungiert DivIVA als Schlüsselregulator für polares Wachstum und Entwicklung, indem es an der Hyphenspitze lokalisiert und dort die Peptidoglykansynthese beeinflusst [59, 109]. Bei Nährstofflimitierung beginnen diese Bakterien in Abhängigkeit von DivIVA an der Zellseite neue Abzweigungen auszubilden, so dass bei weiterem Längenwachstum Strukturen entstehen, die dem von Pilzen bekannten Luftmycel ähneln [76].

Auch wenn DivIVA-Homologe bisher nur in Gram-positiven Organismen nachgewiesen wurden, besitzen das Gram-negative Bakterium *C. crescentus* und nahe Verwandte ein funktionell analoges Protein. Hier ist PopZ (*polar organizing protein Z*) an der Verankerung der Chromosomen im Bereich des Replikationsursprungs an den Zellpolen beteiligt und steuert die polare Morphogenese und Ausbildung der zellulären Asymmetrie [22, 49].

### 1.1.2 Akzessorische Proteine

Die durch FtsZ in der Zellteilungsebene gebildete Struktur rekrutiert auf direktem und indirektem Wege alle weiteren Komponenten des Divisoms. Dabei interagiert FtsZ in der ersten Phase mit Proteinen, die an der Stabilisierung des Z-Rings sowie dessen Verankerung an der Zellmembran beteiligt sind. Von Bedeutung sind hier das Aktin-Homolog FtsA und die Proteine ZapA und ZipA [2]. Zu diesem Zeitpunkt kann die Assoziation von FtsZ mit dem ABC-Transporter-Komplex FtsE/X die Stabilisierung des Z-Rings unter hohem osmotischen Druck fördern [148]. In einem zweiten Schritt werden weitere Bestandteile des Zellteilungsapparates, wie der FtsQLB-Komplex und das Protein FtsK, welches eine Rolle für die Chromosomensegregation spielt, zum Z-Ring rekrutiert. Als letztes lokalisieren Proteine wie FtsW, die Peptidoglykansynthase PBP3 (auch als FtsI bezeichnet) und das Murein-bindende Protein FtsN zur Zellmitte. Diese Komponenten kontrollieren zusammen mit weiteren Proteinen (unter anderem dem Tol/Pal-Komplex und verschiedenen Murein-Hydrolasen) die Einschnürung der Zellwand und der äußeren Membran sowie die Balance zwischen Synthese und Hydrolyse des Peptidoglykans, um letztendlich zwei neue Zellpole zu modulieren und die Trennung der Tochterzellen zu sichern [42].

Auf der Suche nach Faktoren, die für Ausbildung und Erhalt der Stäbchenform von Bedeutung sind, wurde das *mre* (beziehungsweise *rodA*) -Operon identifiziert. Neben MreB sind in diesem auch die Proteine MreC, MreD und RodA codiert [184, 120]. Das 9-Transmembranprotein RodA ist essentiell für die Ausbildung der zylindrischen Form in *E. coli*, *B. subtilis*, *C. crescentus* und weiteren Bakterien [42]. RodA interagiert mit der Peptidoglykansynthase PBP2 und scheint in Assoziation mit MreB für den Großteil der lateralen Zellwandsynthese verantwortlich zu sein. Ebenso werden die beiden Proteine MreC und MreD mit dem Längenwachstum assoziiert. MreC besitzt in den meisten bisher untersuchten Bakterien eine N-terminale Transmembrandomäne, doch der größte Teil des Proteins ist in Richtung Periplasma orientiert (in *C. crescentus* liegt das gesamte Protein im Periplasma vor), während MreD die innere Membran Gram-negativer Bakterien mit 5 Helices durchspannt und keine größeren Bereiche in Richtung Zyto- oder Periplasma weisen. Beide Proteine umgeben den Zellkörper in einer helikalen Struktur ähnlich wie MreB [46, 192]. Über *Bacterial two-hybrid* Analysen konnte eine Interaktion von MreC mit MreD und MreB gezeigt werden [98, 192].

Verschiedene aktuelle Studien konnten das Membranprotein RodZ (ehemals YfgA in *E. coli*) identifizieren, welches ähnlich wie MreB, MreC und MreD helikale Strukturen entlang der lateralen Achse der Zelle ausbildet. Eine Deletion von RodZ führt zu einem Verlust der charakteristischen MreB-Helix und daraus folgend zum Abrunden der Zellen [158, 17]. Dieses Protein scheint ebenso wie RodA und MreD ein Verbindungsglied zwischen dem zytoplasmatischen MreB und den Peptidoglykansynthasen im Periplasma zu sein [6].

### 1.1.3 Die Peptidoglykansynthese

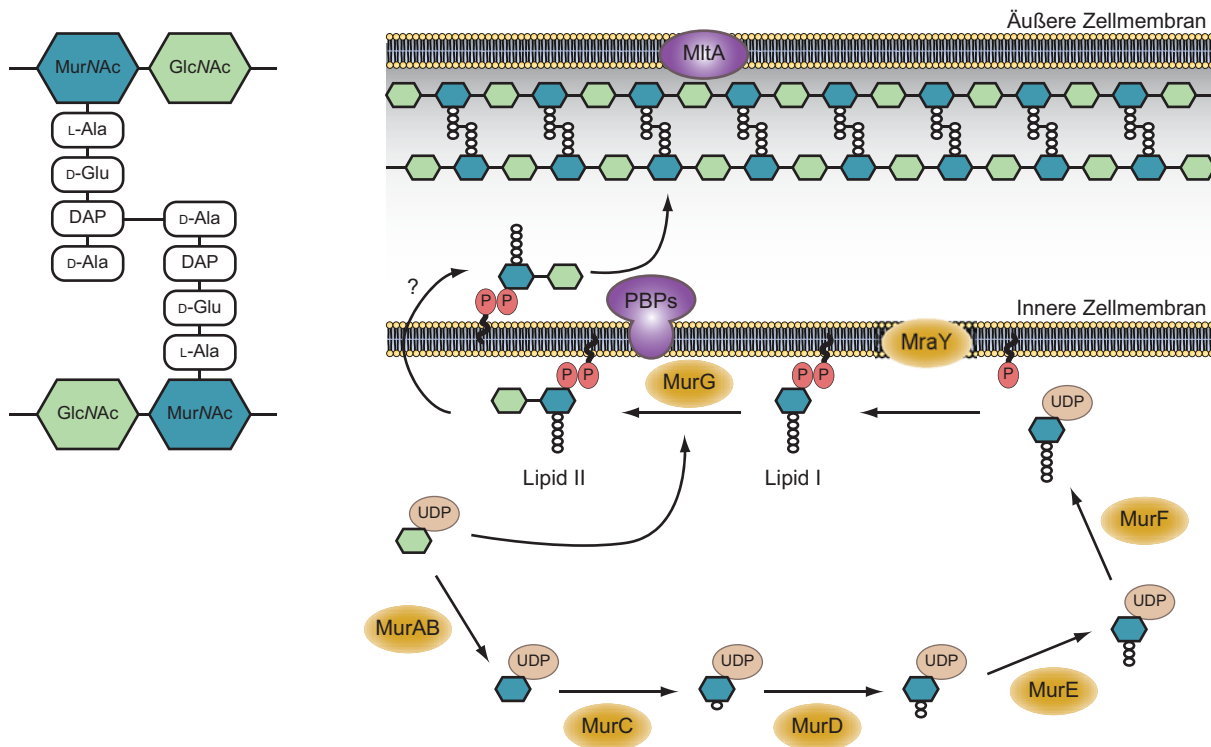
Die Zytoskelettelemente definieren die Zellform. Diese aber auch gegen den von innen wirkenden Turgordruck oder äußere Einflüsse zu schützen ist Aufgabe der Zellwand. Dem entsprechend führt die Behandlung stäbchenförmiger Bakterien mit Lysozym, welches das Peptido-



glykan der Zellwand aufbricht, zur Ausbildung von Sphäroplasten [188]. Die so bezeichneten Zellen verlieren nicht nur ihre typische Form und runden sich ab, sondern reagieren auch sensibel auf Veränderungen der Osmolarität. Unterstützt werden diese Daten außerdem durch die Erkenntnis, dass die Zellwand die Gestalt einer Bakterienzelle exakt abbildet. So besitzen die isolierten Sacculi eine der lebenden Zelle entsprechende Form [189].

Peptidoglykan ist der Hauptbestandteil der bakteriellen Zellwand. Das daraus gebildete Makromolekül besteht aus einem Netzwerk von Glykansträngen aus *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) und *N*-Acetylmuraminsäure (MurNAc), die  $\beta(1\rightarrow4)$ glycosidisch miteinander verknüpft sind (Abbildung 1.3). Die D-Lactylgruppe eines jeden MurNAc-Moleküls ist mit einer Oligopeptidkette verbunden, deren Aufbau variieren kann, häufig aber die Sequenz L-Ala-D-Glu-*meso*DAP (oder L-Lys)-D-Ala-D-Ala besitzt, wobei DAP für Diaminopimelinsäure steht. Der letzte D-Ala-Rest der Peptidkette wird während des Einbaus in das Makromolekül abgespalten. In *E. coli* verläuft die Vernetzung der Glykanstränge über die Verknüpfung der Carboxylgruppe des D-Ala an Position 4 einer Peptidkette mit einer Aminogruppe der Diaminopimelinsäure an Position 3 eines benachbarten Peptids. Ist statt eines DAP- ein L-Lys-Rest in der Peptidkette vorhanden erfolgt die Verbindung indirekt über eine kurze Interpeptidbrücke (zum Beispiel bei *Staphylococcus aureus*). Der Peptidanteil macht die Struktur des Murein-Sacculus flexibel und dehnbar. Während die Glykanstränge relativ starr und unflexibel sind, können sich die Peptidketten um das Vierfache strecken. Damit ist es Zellen möglich, auf plötzliche Schwankungen des osmotischen Drucks zu reagieren [183].

Die Synthese des Peptidoglykans beginnt im Zytoplasma mit dem Zusammenbau eines Vorläufer-Moleküls [15]. Im ersten Schritt einer ganzen Kaskade von enzymatischen Reaktionen wird, katalysiert durch MurA und MurB, UDP-aktiviertes *N*-Acetylglucosamin zu UDP-*N*-Acetylmuraminsäure umgewandelt. Mit Hilfe der Mur-Ligasen (MurC, D, E und F) werden dann schrittweise die verschiedenen Aminosäuren der Oligopeptidkette auf die D-Lactylgruppe von UDP-MurNAc übertragen. Das Membranprotein MraY katalysiert den Transfer des resultierenden Phospho-MurNAc-Pentapeptid-Rests von UDP-MurNAc auf das Trägermolekül Undecaprenol (Bactoprenol) -Phosphat, wobei das sogenannte Lipid I entsteht. Durch die membran-assoziierte Glykosyltransferase MurG wird ein GlcNAc auf diesen Peptidoglykanvorläufer übertragen und so das Lipid II gebildet. Da alle weiteren Schritte der Peptidoglykansynthese im Periplasma ablaufen, muss Lipid II über einen bisher noch nicht geklärten Mechanismus (katalysiert durch eine „Flippase“) durch die Zellmembran bewegt werden. Die nun folgenden Reaktionen werden von Multienzymkomplexen bestehend aus Mureinhydrolasen (Autolysinen), Glykosyltransferasen und Transpeptidasen katalysiert, wobei Glykosyltransferasen und Transpeptidasen zusammenfassend auch als Peptidoglykansynthasen bezeichnet werden. Autolysine, wie etwa MltA aus *E. coli*, können Bindungen zwischen den einzelnen Zucker- oder Aminosäureresten des bestehenden Peptidoglykannetzwerks lösen und die Glykosyltransferasen katalysieren dann die Verlängerung von bereits existierenden Glykansträngen oder den Einbau eines neuen Glykanstranges mit Hilfe des Lipid II-Moleküls. Die Quervernetzung benachbarter Glykanstränge über die Peptidreste wird später von den Transpeptidasen katalysiert. Diese Enzyme ersetzen die Peptidbindung am D-Ala-D-Ala-Rest des Lipid II gegen eine Peptidbindung an eine Peptidkette des Mureins (Transpeptidierung).



**Abbildung 1.3:** Modell der Peptidoglykansynthese. Auf der linken Seite ist eine schematische Darstellung der Mureinschicht abgebildet, wie sie in *E. coli* zu finden ist. Die Glykanstränge, bestehend aus *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) und *N*-Acetylmuraminsäure (MurNAc), werden über eine Amidbindung zwischen dem Diaminopimelinsäure- und dem D-Ala-Rest benachbarter Stränge verknüpft. Die Abbildung auf der rechten Seite soll die unterschiedlichen Schritte der Peptidoglykansynthese verdeutlichen, wobei zwischen zytoplasmatischen Reaktionen (katalysiert durch MurA bis F), Modifikationen an der inneren Membran (über MraY und MurG) und dem Einbau des Vorläufermoleküls in den Mureinsacculus im Periplasma unterschieden werden kann (Informationen zu den einzelnen Reaktionen siehe Text). Abbildung modifiziert nach [192].

In vielen Bakterien treten bifunktionelle Enzyme auf, die sowohl eine Glykosyltransferase- als auch eine Transpeptidase-Aktivität aufweisen.

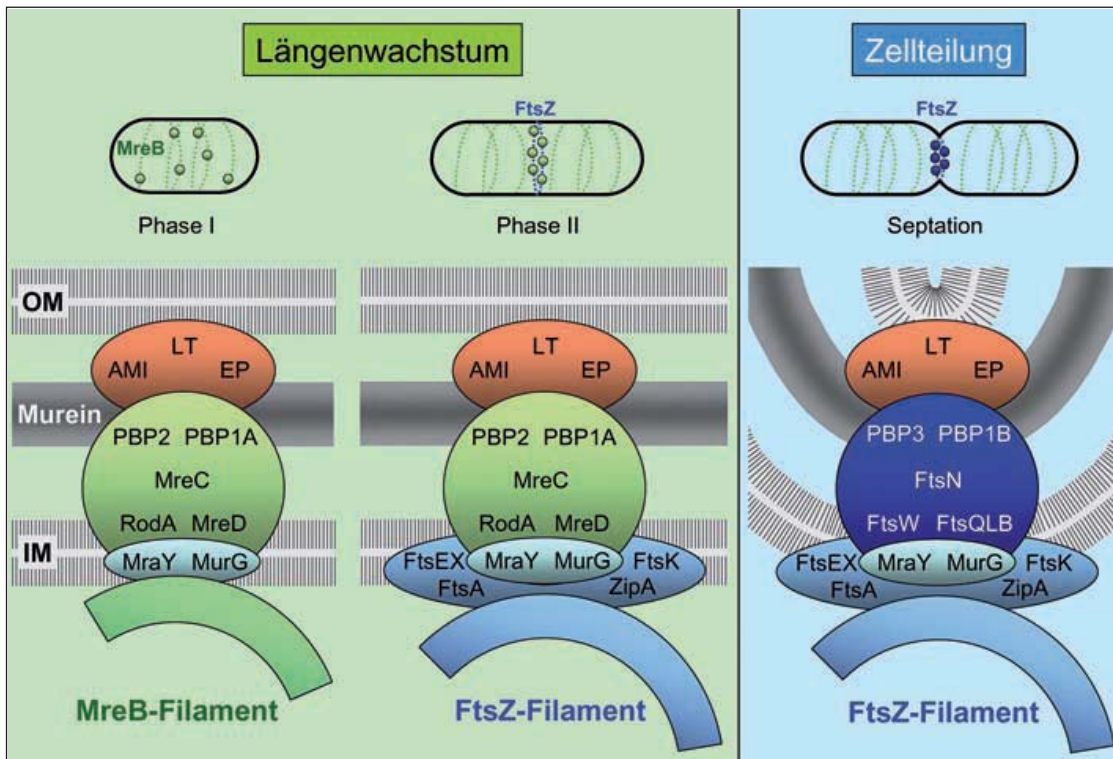
Da Penicilline und andere  $\beta$ -Lactam-Antibiotika eine strukturelle Ähnlichkeit mit dem D-Ala-D-Ala-Rest besitzen, können diese kovalent an Transpeptidasen binden und diese hemmen. Ein Großteil der verschiedenen Peptidoglykansynthasen konnte so aufgrund der Fähigkeit, zum Beispiel radioaktiv markiertes Penicillin zu binden, identifiziert werden [21, 162, 97]. Diese Enzyme tragen deshalb auch die Bezeichnung Penicillin-bindende Proteine (PBPs).

Die Verwendung von Multienzymkomplexen für den Einbau neuer Peptidoglykanfragmente ermöglicht die räumliche und zeitliche Koordination der Peptidoglykansynthese. Um einen neuen Baustein in das vorhandene Netzwerk einzusetzen, muss zuvor die Verknüpfung zwischen den Aminoazuckern gelöst werden. Da dieser Prozess aufgrund des Turgordrucks die strukturelle Integrität der Zelle bedroht, muss das Aufbrechen alter Bindungen mit der Ausbildung neuer Verknüpfungen gekoppelt werden. Nach dem Modell von Joachim-Volker Höltje [80] werden dabei in Gram-negativen Bakterien drei neue Glykanstränge eingesetzt, während ein alter, unter Zugspannung stehender Strang, entfernt wird (3-für-1-Modell). Bei Gram-positiven Zellen mit ihrer dicken Zellwand geht man von einer Art Häutung aus. Eine neue,

dehnbare Mureinschicht wird von unten an die unter Zugspannung stehende Zellwand angelagert. Nach Abbau der äußeren (alten) Schichten über Mureinhydrolasen wird die neue Schicht durch den Turgor der Zelle nach außen geschoben und gedehnt, was das Wachstum der Bakterien ermöglicht.

Nach neuesten Erkenntnissen beschränken sich die beschriebenen Multienzymkomplexe nicht nur auf periplasmatische Proteine. Das an der Synthese der Peptidoglykanvorläufer beteiligte Protein MurG konnte in Enzymkomplexen mit Proteinen für laterales Wachstum sowie zur Zellteilung nachgewiesen werden [123]. Zusätzlich kann auch eine Assoziation der im Zytoplasma vorliegenden Enzyme MurB bis MurF und des Membranproteins MraY mit der Peptidoglykansynthese-Maschinerie im Periplasma in Betracht gezogen werden [192] (zur Verdeutlichung der entstehenden Komplexe siehe Abbildung 1.4).

Während des Wachstums und der Teilung der Zelle werden die Peptidoglykan-synthetisierenden Enzyme über das bakterielle Zytoskelett zu definierten Bereichen der Zellhülle transportiert. Dabei unterscheidet man in stäbchenförmigen Bakterien Enzymkomplexe, die für den lateralen Einbau von Peptidoglykan verantwortlich sind (oft als Elongase-Komplexe bezeichnet), von denen, die für die Zellteilung und, damit verbunden, für die Polmorphogenese benötigt werden (Abbildung 1.4). Für die Erhaltung der zylindrischen Form muss die Aktivität dieser unterschiedlichen Maschinerien sorgfältig ausbalanciert werden [114].



**Abbildung 1.4:** Modell der Mureinsynthesekomplexe und deren Assoziation mit dem bakteriellen Zytoskelett bei Längenwachstum und Zellteilung in *E. coli*. Die Mureinsynthesekomplexe bestehen aus Subkomplexen für die Synthese von Lipid II (mit MraY und MurG), für Synthese und Einbau des neuen Mureins (grüner und dunkelblauer Kreis) und für die Hydrolyse des alten Mureins (roter Kreis; mit Amidasen (AMI), lytischen Transglykosylasen (LT) und Endopeptidasen (EP)). Gezeigt sind Zusammensetzung und zelluläre Lokalisation der Mureinsynthesekomplexe während des Zellzyklus. IM: innere Membran, OM: äußere Membran. Entnommen aus [182].

MreB und assoziierte Proteine kontrollieren die Mureinsynthese während der meisten Zeit des Längenwachstums. Dabei ist MreB zusammen mit direkt oder indirekt verbundenen Proteinen zum Beispiel für die helikale Lokalisation der Peptidoglykansynthase PBP2 in *C. crescentus* verantwortlich [57, 46]. Die helikale Anordnung dieses Enzyms führt zu einem einheitlich über die Zelllänge verteilten Einbau neuer Zellwand und somit zu einem gleichmäßigen Längenwachstum.

Im Verlauf einer kurzen Phase direkt vor Beginn der Zellteilung wird das Längenwachstum auch durch FtsZ beeinflusst. In *C. crescentus* konnte eine FtsZ-abhängige Rekrutierung von MurG beschrieben werden, die zu einer Verlängerung der Zellwand im medialen Teil der Zelle führt [1]. Vor kurzem konnten diese Ergebnisse auch in *E. coli* bestätigt werden, wobei hier auch die Abhängigkeit des Peptidoglykaneinbaus von dem für das Längenwachstum verantwortlichen Enzym PBP2 demonstriert werden konnte [178]. Die Rekrutierung von PBP2 durch MreB oder FtsZ ist dabei von unterschiedlichen akzessorischen Proteinen abhängig. Während die Lokalisation der Peptidoglykansynthase zur lateralen Zellwand über MreC gesteuert wird, erfolgt die FtsZ-abhängige Rekrutierung zur Zellmitte zu einem Zeitpunkt, wenn FtsZ schon mit frühen Zellteilungsproteinen wie FtsA, ZipA, FtsEX und FtsK assoziiert vorliegt [98, 42].

Der während der Zytokinese ablaufende Zellwandumbau wird durch FtsZ zusammen mit den zum Divisom gehörenden Zellteilungsproteinen koordiniert. Die entscheidenden Biosyntheseenzyme für diesen Schritt sind in *E. coli* PBP1B und PBP3, welche miteinander interagieren. Die Lokalisation dieser Peptidoglykansynthasen zur Teilungsebene wird dabei durch die Assoziation zwischen PBP3 und FtsW vermittelt [18].

Ob diese Aufgabenverteilung die Verhältnisse in der Zelle korrekt wiedergibt, bleibt abzuwarten. So wurde eine weitere Rolle für FtsZ bei der Peptidoglykansynthese in den lateralen Bereichen in der Nähe der Pole für *E. coli* vorgeschlagen [177].

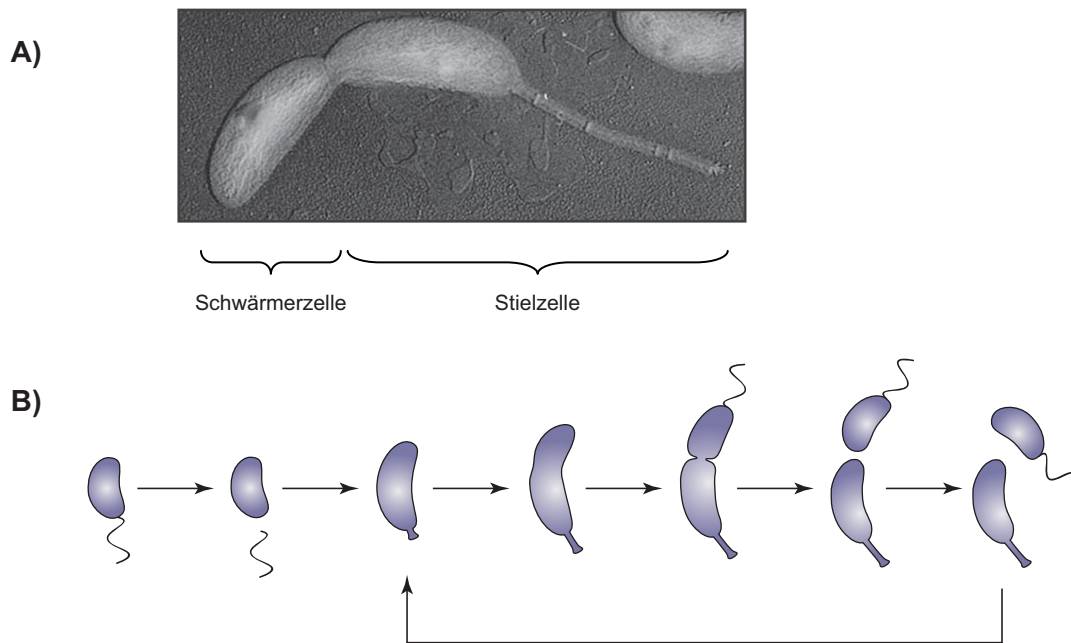
## 1.2 Die verschiedenen Gesichter des *Caulobacter crescentus*

Der in dieser Arbeit hauptsächlich verwendete Organismus *Caulobacter crescentus* ist ein Gram-negatives Bakterium der Klasse  $\alpha$ -Proteobacteria. Erstmals beschrieben wurde dieses aquatische Bakterium 1935 von Henrici and Johnson als *Caulobacter vibrioides* [78, 134]. Das Genom wurde 2001 vollständig sequenziert [128]. Die Zellen sind bei Kultivierung in Komplexmedium 1 – 2  $\mu\text{m}$  lang und weisen eine halbmondförmige (crescente) Erscheinung auf, die durch das Intermediärfilament-ähnliche Protein Crescentin (siehe Abschnitt 1.1.1) vermittelt wird.

### 1.2.1 Morphologische Veränderungen im Verlauf des Zellzyklus

Als Modellorganismus ist *C. crescentus* aufgrund der asymmetrischen Zellteilung und der sich daraus ergebenden Möglichkeit von Zellzyklusstudien an Bakterien gut untersucht. Bei der Teilung entstehen zwei morphologisch klar zu unterscheidende Zellen - eine Schwärmer- und eine Stielzelle (siehe Abbildung 1.5). Die Schwärmerzelle besitzt ein polares Flagellum sowie





**Abbildung 1.5:** Morphologie von *Caulobacter crescentus*. **A)** Elektronenmikroskopische Aufnahme einer *Caulobacter*-Zelle kurz vor der Teilung (entnommen aus [137]) **B)** Schematische Darstellung des Zellzyklus von *C. crescentus*. Eine frei bewegliche Schwärmerzelle ist nicht in der Lage, die Zellteilung einzuleiten. Sie muss erst den mobilen Lebensstil aufgeben und zu einer Stielzelle ausdifferenzieren, bevor sie die DNA replizieren kann, was eine Voraussetzung für die Zellteilung darstellt. Nach der erfolgten Teilung kann die Stielzelle sofort eine neue Reproduktion beginnen, während die Schwärmerzelle erst die entsprechend notwendige Entwicklung vollziehen muss.

TypIV-Pili und ist in der Lage, sich frei in flüssigem Nährmedium zu bewegen und sich auf der Suche nach Nährstoffen von der zweiten Tochterzelle zu entfernen.

Diese zweite Zelle besitzt an einem Pol eine Prostheka, einen Stiel-artigen Fortsatz des Zellkörpers, aufgrund dessen sie auch als Stielzelle bezeichnet wird. Die Prosthecae von *C. crescentus* sind im Gegensatz zu vielen anderen bekannten Zellanhängen in Bakterien, die nur aus Proteinen oder Kohlenhydraten bestehen, eine Ausstülpung des Zellkörpers, einschließlich eines dünnen Streifens Zytoplasma sowie der diesen umgebenden Peptidoglykanschicht und den zwei Membranen. Trotz der Verbindung zum Zytoplasma des Zellkörpers konnten im Fortsatz weder DNA noch Ribosomen nachgewiesen werden [134]. Außerdem fehlen die meisten zytoplasmatischen Proteine, wohingegen einige Membranproteine und periplasmatische Proteine verstärkt auftreten [86]. Im Stiel selbst konnten besondere ringförmige Strukturen nachgewiesen werden, die senkrecht zur Längsachse verlaufen (die sogenannten *Crossbands*). Ihre Funktion konnte bisher noch nicht endgültig geklärt werden, vermutlich sind sie für die Stabilisierung und/ oder Kompartimentalisierung der Prostheka von Bedeutung [90]. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass die Synthese der *Crossbands* Zellzyklus-abhängig ist (ihre Anzahl kann als Indikator für das Zellalter dienen) und das Vorhandensein von funktionellem FtsZ erfordert [137, 45]. Die Verlängerung des Fortsatzes geschieht von der Basis aus und ist abhängig von MreB und RodA sowie von der Peptidoglyk synthase PBP2 [1, 185]. Der Stiel trägt an der Spitze ein Adhäsionsorganell und ermöglicht es der Zelle, sich durch Absonderung

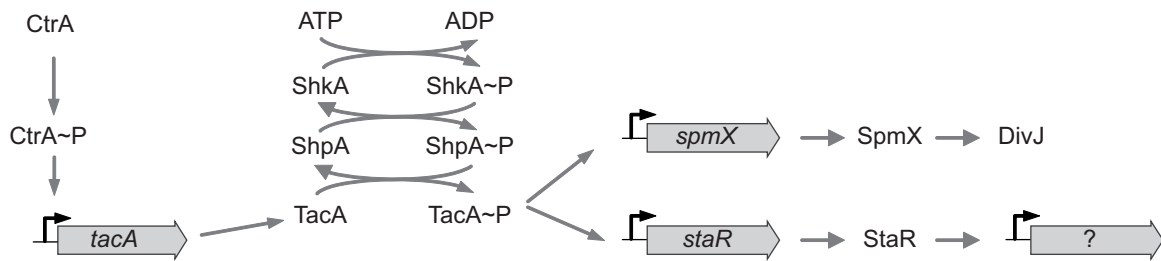
eines Polysaccharid-Klebstoffes an Oberflächen anzuhaften und damit den planktonischen Lebensstil aufzugeben [135, 174].

Nur die Stielzelle ist in der Lage, das Chromosom zu replizieren und damit eine neue Zellteilung zu initiieren. Dabei kommt es zu einem verstärkten Längenwachstum und zur Ausbildung eines neuen Flagellums am Pol gegenüber des Stiels, bevor sich die Zelle etwa in der Mitte einschnürt. Die Teilung erfolgt dabei nicht exakt in der Zellmitte, so dass die entstehende Schwärmerzelle etwas kleiner als die Stielzelle ist. Nach erfolgter Abtrennung der Schwärmerzelle kann die bestielte Zelle sofort mit einer weiteren Reproduktion beginnen und wird deshalb auch als Mutterzelle oder Stammzelle bezeichnet [166].

In der Schwärmerzelle dagegen wird die Replikation der DNA durch den Zellzyklusregulator CtrA unterdrückt [139]. Erst wenn sich die Schwärmerzelle zu einer Stielzelle differenziert hat, kann auch sie eine Zellteilung durchführen. Während des dafür notwendigen Entwicklungsprogramms wirft die Zelle das Flagellum ab, zieht die am gleichen Pol befindlichen Typ IV-Pili ein und bildet am nun freien Pol die Prostheka aus.

Die beschriebenen morphologischen Veränderungen einschließlich des Wandels im Lebensstil (von beweglich zu sessil) sowie die Verdopplung der DNA werden dabei in *C. crescentus* durch stringente Regulationsmechanismen koordiniert. Der korrekte Ablauf des Zellzyklus wird dafür auf mehreren Ebenen kontrolliert: durch zeitlich begrenzte Aktivierung oder Reprimierung der Transkription, veränderter Phosphorylierung von regulatorischen Proteinen in Zweikomponentensystemen und durch Proteolyse von regulatorischen oder strukturellen Proteinen [105, 159, 67].

Die Zellzyklus-abhängige Biogenese des Stiels wird durch eine komplexe Signalkaskade mittels des  $\sigma^{54}$ -abhängigen Transaktivators TacA erreicht [160, 20]. Die Synthese und Aktivierung von TacA ist dabei essentiell für die Ausbildung der Prostheka in Komplexmedium. Die Transkription von *tacA* wird von CtrA aktiviert und erfolgt abhängig von dem alternativen Sigma-Faktor  $\sigma^{54}$  (codiert durch das Gen *rpoN*). Über Phosphorylierung durch die Hybrid-histidinkinase ShkA (*stalk biogenesis histidine kinase A*) und die Histidinphosphotransferase ShpA (*stalk biogenesis histidine phosphotransferase A*) wird zusätzlich die Aktivität des Proteins kontrolliert (Abbildung 1.6). Bisher konnten nur zwei Gene identifiziert werden, deren Transkription direkt durch TacA aktiviert wird und die einen Einfluss auf die Stielbiogenese haben. Das Muramidase-Homolog SpmX (*stalked pole muramidase homolog X*) lokalisiert während des Schwärmer-zu-Stielzellen-Übergangs an den Pol und kontrolliert die Lokalisation und Aktivierung der Kinase DivJ. Dieses Protein ist an globalen Prozessen wie der Zellzyklusregulation und der Ausbildung der Asymmetrie in *C. crescentus* beteiligt [140]. Das zweite durch TacA induzierte Gen codiert für den Transkriptionsregulator StaR (*stalk biogenesis regulator*). Eine Deletion von *staR* führt zu einer leichten Verkürzung des Stiels, während eine Überproduktion leicht verlängerte Fortsätze, aber auch Zellteilungs- und Zellformdefekte bedingt [20]. Bis zum heutigen Zeitpunkt konnte noch kein Faktor identifiziert werden, der einzig auf die Ausbildung der Prostheka zu einer bestimmten Zeit des Zellzyklus wirkt, ohne andere, globale Prozesse zu beeinflussen. Des weiteren konnten die durch eine Deletion von *tacA* bedingten Defekte in der Ausbildung des Stiels bei Kultivierung der Zellen in Medium mit geringen Phosphatmengen (siehe Abschnitt 1.2.2) kompensiert werden [20], was darauf schließen lässt, dass TacA nicht der einzige Regulator der Stielbiogenese ist.



**Abbildung 1.6:** Zellzyklus-abhängige Regulation der Stielbiogenese über TacA. Der phosphorylierte Zellzyklusregulator CtrA initiiert die Transkription des Gens *tacA*. Nach der Aktivierung des Transkriptionsregulators TacA mittels Phosphorylierung durch ShpA werden die Gene für SpmX und StaR induziert. SpmX dient als Lokalisationsfaktor für DivJ, während die Zielgene für den Transkriptionsregulator StaR noch nicht identifiziert wurden. Modifiziert nach [20].

Kürzlich konnte BamE, ein Protein der äußeren Membran und Bestandteil des BAM-Komplexes, mit der zeitlichen Initiation der Stielbiogenese in Verbindung gebracht werden [150]. Analog zum SAM-Komplex in Mitochondrien sind die Komponenten des BAM-Komplex essentiell für den Einbau von  $\beta$ -barrel-Strukturen in die äußere Membran und könnten so die Aktivität von Faktoren regulieren, die zur Synthese der Prostheka benötigt werden.

### 1.2.2 Kontrolle der Zellform bei Nährstofflimitierung

*C. crescentus* ist ubiquitär in Frischwasser-Seen und Flüssen zu finden und konnte sogar aus destilliertem Wasser im Labor isoliert werden [134]. Der Organismus ist adaptiert an ein Überleben unter Bedingungen, bei denen nur wenige Nährstoffe zur Verfügung stehen, und wächst kaum in Nährmedien wie sie zum Beispiel für die Kultivierung von *E. coli* genutzt werden [52].

Ein limitierender Faktor für die Reproduktion von Bakterien in Frischwasser ist eine adäquate Versorgung mit Kohlenstoff, Stickstoff und Phosphor [130]. Vor kurzem konnte demonstriert werden, dass ein Mangel an Stickstoff zu einer Verlängerung der Schwärmerzellphase in *C. crescentus* führt, während die Zellform durch eine Verknappung von Kohlenstoff oder Stickstoff aber nicht beeinflusst wird [54, 108]. Wird *C. crescentus* dagegen in einem Medium angezogen, in dem weniger als 30  $\mu\text{M}$  Phosphatsalze als Phosphorquelle vorhanden sind, verändert sich die Zellmorphologie deutlich (Abbildung 1.7A). Der Zellkörper wird bei unverändertem Durchmesser auf die doppelte Länge ausgeweitet und die polare Prostheka stark verlängert. Während bei Kultivierung in Komplexmedium mit einem Überschuss an Phosphor die Prostheka mit einer Länge von circa 1 – 2  $\mu\text{m}$  etwa der halben Länge des Zellkörpers entspricht, können die Fortsätze bei einem Mangel an Phosphat auf eine Länge von bis zu 30  $\mu\text{m}$  ausgedehnt werden [155]. Es gibt mehrere Hypothesen, warum die Zellen diese energieaufwendige Änderung der Form auf sich nehmen [155, 133]: Die Verlängerung des Zellfortsatzes ermöglicht ihnen, sich aus einer ungünstigen Umgebung (zum Beispiel in einem Biofilm) zu entfernen, da die bestielte Zelle mit der Spitze der Prostheka an Oberflächen adhärirt ist und dies die einzige Möglichkeit ist, den Zellkörper in Regionen mit größerem Nährstoffangebot zu bringen. Auf der anderen Seite erhöht ein langer, dünner Fortsatz die effektive Oberfläche der Zelle und ermöglicht so einen verstärkten Transport über in der Membran vorhandene

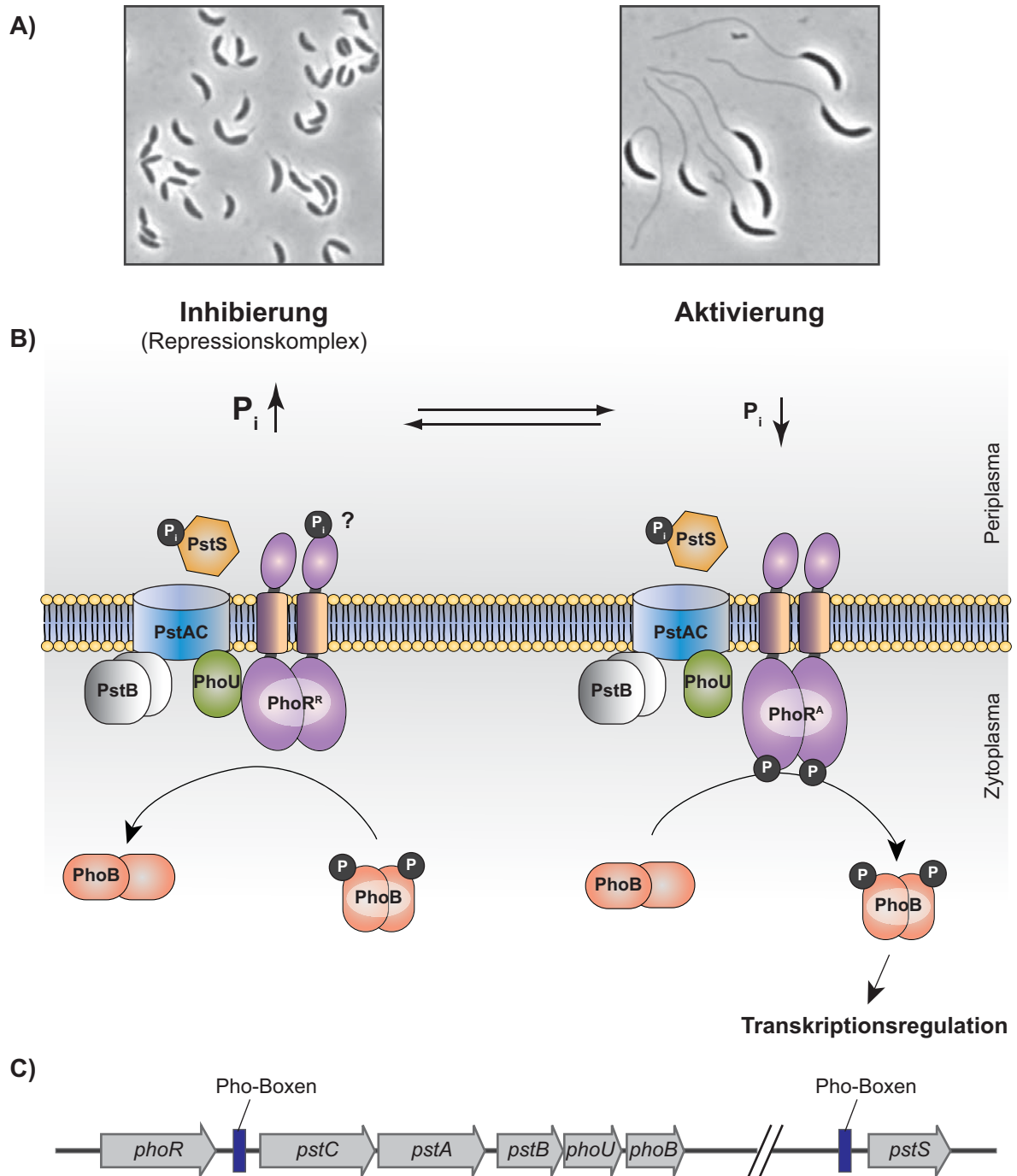
Importsysteme [186].

Phosphor ist ein essentielles Element und wird vor allem in Form von anorganischem Phosphat ( $P_i$ ) aufgenommen. Bei einer Verknappung an Phosphor sind Bakterien in der Lage, ihre Fähigkeit, anorganisches Phosphat aufzunehmen oder es aus organischen Phosphatquellen freizusetzen, zu verstärken [145]. In *E. coli* ist die Aufnahme von anorganischem Phosphat gut untersucht und erfolgt bei geringen Konzentrationen von  $P_i$  im Medium über das Phosphat-spezifische Transportsystem PstSCAB (Abbildung 1.7B). Die damit assoziierten Gene sind Teil des Phosphat (Pho)-Regulon, das heißt sie werden bei Phosphatmangel durch den Transkriptionsregulator PhoB (siehe unten) kontrolliert [187]. PstA und PstC sind kanalbildende Proteine, die eine Pore in der inneren Membran formen und mit dem zytoplasmatischen PstB, einer sogenannten Traffic-ATPase, interagieren. Dieser Typ von ATPasen besitzt zwei ATP-bindende Domänen, die durch charakteristische Sequenzmotive (Walker A- und B-Boxen) gekennzeichnet sind und durch Bindung und Hydrolyse von ATP die für den Transport benötigte Energie liefern. Da PstB nur ein ATP-Bindemotiv aufweist, liegt das Protein in der Zelle wahrscheinlich als Dimer vor. Im Periplasma befindet sich das mit hoher Affinität an Phosphat bindende Protein PstS, welches einmal gebundenes  $P_i$  zum PstCAB-Komplex transportiert. Zusammen bilden diese vier Komponenten einen bakteriellen ABC-Transporter.

Mit dem Transportsystem sind mehrere regulatorische Proteine assoziiert. Unter Bedingungen, bei denen ausreichende Mengen an Phosphat vorhanden sind, interagiert ein als PhoU bezeichneter Repressor mit den PstSCAB-Proteinen und bildet einen sogenannten Repressionskomplex, der mit der membrangebundenen Sensorhistidinkinase PhoR interagiert und deren Phosphorylierung verhindert. PhoR dient als  $P_i$ -Sensor, wobei noch nicht geklärt werden konnte, ob die Detektion direkt über Domänen im Protein selbst oder durch die Interaktion mit dem PstSCAB-Komplex vermittelt wird. Tritt ein Mangel an  $P_i$  auf, wird die Interaktion mit PhoU gelöst und PhoR kann sich autophosphorylieren. Phosphoryliertes PhoR überträgt das Phosphat auf einen als PhoB bezeichneten Transkriptionsregulator und aktiviert diesen. PhoB ist ein in Bakterien stark konservierter Regulator, der die Expression von Genen kontrolliert, die mit dem Transport oder Metabolismus von Phosphat in Verbindung gebracht werden konnten. Die Transkriptionsregulation durch PhoB ist abhängig von einer *cis*-regulatorischen Sequenz (die sogenannte Pho-Box) in der Promotorregion von Genen [118]. Diese Sequenz besteht aus einem Motiv aus zweimal 7 konservierten Basen, die durch eine 4 Basen große Lücke voneinander getrennt sind (Consensus CTGTCAT\*\*\*\*CTGTCAT). Das Vorhandensein eines solchen Motivs konnte auch in anderen Bakterien neben *E. coli* nachgewiesen werden [167, 125]. Phosphoryliertes PhoB aktiviert die Transkription der Gene des Pho-Regulons in *E. coli* durch Bindung an die Pho-Box und Interaktion mit der  $\sigma^{70}$ -Untereinheit der RNA-Polymerase [117].

Da *C. crescentus* ein PhoR-Homolog besitzt, lag die Vermutung nahe, dass die phosphat-abhängige Verlängerung des Stiels möglicherweise über das PhoRB-Zweikomponentensystem reguliert wird. Eine erste Studie konnte die Gene für PstSCAB in diesem Organismus identifizieren und ihre Regulation über PhoB aufdecken [68]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass PhoB für die Verlängerung des Stiels bei Phosphatmangel essentiell, für die eigentliche Biogenese und deren Koordination mit dem Zellzyklus aber vernachlässigbar ist. Die Gene *phoR*, *pstC*, *pstA*, *pstB*, *phoU* und *phoB* sind in *C. crescentus* in einem *pst-pho*-Gencluster organisiert, während das PstS-Homolog an einem nicht damit verbundenen Locus codiert





**Abbildung 1.7:** Reaktion auf geringe Phosphatmengen. **A)** Phasenkontrastaufnahmen von Wildtyp-*Caulobacter*-Zellen, kultiviert in Medium mit moderater (links) oder niedriger (rechts) Menge an Phosphat. Aufnahmen entnommen aus [68] **B)** Schematische Darstellung der Signaltransduktion als Antwort auf verschiedene Phosphatmengen nach Erkenntnissen aus *E. coli*. Abgebildet sind der Kanal aus PstAC, das periplasmatische Protein PstS, die ATPase PstB, der Repressor PstU, die Sensorhistidinkinase PhoR in reprimierter (R) und aktivierter (A) Form und der Transkriptionsregulator PhoB. Adaptiert nach [187]. **C)** Schematische Darstellung des Pho-Regulon in *C. crescentus*. Pho-Boxen sind in Blau gehalten.

wird (Abbildung 1.7C). In den Promotorregionen von *pstC* und *pstS* konnten jeweils mehrere Pho-Boxen identifiziert werden. Die Deletion von *pstS* führt zu einer stark eingeschränkten Phosphataufnahme und dadurch zu *C. crescentus*-Zellen, die auch bei Kultivierung in phosphatreichem Medium einen langen Stiel ausbilden. Dieser Phänotyp ist abhängig von einer Signaltransduktion über PhoB, da die gleichzeitige Deletion von *phoB* zu einer Verkürzung des Fortsatz auf seine für diese Umgebungen natürliche Länge führt [68].

Die Morphologie der Prostheka in *C. crescentus* wird somit zum einen im Laufe des Zellzyklus, zum anderen aber auch als Antwort auf einen Mangel an anorganischem Phosphat reguliert und den entsprechenden Bedingungen angepasst.

### 1.3 Rahmen der Arbeit

Ziel der hier vorgelegten Arbeit war die Identifikation neuer Faktoren, die in Bakterien an der Ausprägung der Zellform beteiligt sind. Dafür wurde das  $\alpha$ -Proteobakterium *Caulobacter crescentus* als Modellorganismus gewählt, da der Organismus genetisch zugänglich ist und zellzyklus-abhängige und durch Umwelteinflüsse bedingte Änderungen der Zellform in diesem Bakterium beschrieben wurden.

Die morphologischen Veränderungen während der Entwicklung einer beweglichen Schwärmerzelle zur sessilen Stielzelle waren Ausgangspunkt für die Suche nach Proteinen, die an der Modellierung des Zellpols oder der Biogenese der Prostheka beteiligt sind. Hier konnte auf Microarray-Analysen zur Transkriptionsregulation während des Zellzyklus zurückgegriffen werden [105]. Eine nähere Untersuchung der zu diesem Zeitpunkt induzierten Gene führte zur Identifikation von *bacA* und *bacB* in *C. crescentus*. In weiteren Experimenten konnte die Lokalisation der entsprechenden Proteine zum bestielten Pol sowie ihre Fähigkeit zur Ausbildung polymerer Strukturen nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass in *E. coli* produzierte und über chromatographische Methoden aufgereinigte Proteine ohne Zusatz von Co-Faktoren polymerisieren. Mittels Co-Immunpräzipitation wurde die Interaktion von BacA und BacB mit der Peptidoglykansynthase PbpC nachgewiesen. Ebenso wurden zu BacAB homologe Proteine aus anderen Bakterienspezies untersucht, wobei für diese ein ähnliches Polymerisationsverhalten gezeigt werden konnte.

Um die Genregulation bei einem Mangel an Phosphat in *C. crescentus* analysieren zu können, wurden Microarray-Analysen verschiedener Stämme, angezogen in Komplexmedium oder phosphatfreiem Minimalmedium, erstellt. Durch Vergleich der erhaltenen Daten konnte das Pho-Regulon in *Caulobacter* näher bestimmt und der Einfluss eines MarR-ähnlichen Transkriptionsfaktors während der Reaktion auf eine Verknappung an Phosphat gezeigt werden.

## 2 Material und Methoden

In diesem Kapitel werden die für die Ausführung der später vorgestellten Experimente verwendeten Materialien und Methoden beschrieben. Dabei wird in Abschnitt 2.1 auf die genutzten Chemikalien eingegangen, aber auch eine Übersicht zu den verwendeten Medien, Oligonukleotiden, Plasmiden und Bakterienstämmen gegeben. Die Abschnitte 2.2 bis 2.5 beinhalten die detaillierte Beschreibung der angewendeten Methoden sowie, wenn nötig, Informationen zu speziellen, für ein spezifisches Experiment benötigte Chemikalien.

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten allgemeinen Chemikalien wurden über die Firmen Becton Dickinson (USA), Bioline (Deutschland), Carl-Roth (Deutschland), GE Healthcare (Deutschland), Invitrogen (Deutschland), Merck (Deutschland), Perkin Elmer (USA), Peqlab (USA) oder SIGMA-Aldrich (Deutschland) bezogen.

Die Restriktionsenzyme wurden bei New England Biolabs (NEB, USA) oder Fermentas (Kanada) erworben. Enzyme für die Klonierung sowie DNA-, RNA- und Proteinmarker wurden über Fermentas (Kanada) bestellt.

Spezielle Chemikalien und Enzyme werden im Text behandelt.

#### 2.1.2 Puffer und Lösungen

Standardpuffer und -lösungen wurden nach Ausubel [9] und Sambrook [151] hergestellt, spezielle Puffer und Lösungen sind unter den entsprechenden Methoden aufgeführt. Puffer und Lösungen wurden generell in Reinstwasser bereitet und gegebenenfalls autoklaviert (20 min bei 121 °C) oder steril filtriert (Filter der Firma Millipore, Deutschland; Porengröße 0,22 oder 0,45 µm).

#### 2.1.3 Medien

Alle Komplexmedien wurden nach dem Mischen der Bestandteile für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Erst nach dem Abkühlen auf 60 °C wurden hitzelabile Komponenten wie Antibiotika, Glukose oder Xylose zugefügt.

Die Minimalmedien sowie die erwähnten Antibiotika und Kohlenhydratlösungen wurden mit Filtern (Porengröße 0,22 oder 0,45 µm) der Firma Millipore (Deutschland) steril-filtriert.

<b>LB</b> (Luria-Bertani) Medium	1,0 % (w/v)	Trypton
	0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
	1,0 % (w/v)	NaCl

Das entsprechende Festmedium enthält zusätzlich 1,5 % (w/v) Agar.

<b>PYE</b> ( <i>peptone yeast extract</i> ) Medium	0,2 % (w/v)	Bacto™Pepton
	0,1 % (w/v)	Hefeextrakt
	1 mM	MgSO <sub>4</sub>
	0,5 mM	CaCl <sub>2</sub>

Für Festmedium wurde 1,5 % und für Schwärmmedium oder den Softagar für die Phagenpräparation 0,25 % (w/v) Agar zugefügt.

<b>M2G</b> (M2-Minimalmedium mit Zusatz von Glukose)	6,1 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	3,9 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	10 mM	NH <sub>4</sub> Cl
	0,5 mM	MgSO <sub>4</sub>
	0,2 % (w/v)	Glukose
	0,1 % (v/v)	FeSO <sub>4</sub> /EDTA-Lösung <sup>1</sup>
	0,5 mM	CaCl <sub>2</sub>

<b>M2G</b> <sup>-P</sup> -Minimalmedium	20 mM	Tris/HCl (pH 7)
	10 mM	NH <sub>4</sub> Cl
	0,5 mM	MgSO <sub>4</sub>
	0,2 % (w/v)	Glukose
	0,1 % (v/v)	FeSO <sub>4</sub> /EDTA-Lösung <sup>1</sup>
	0,5 mM	CaCl <sub>2</sub>

<b>CTT</b> -Medium	1 % (w/v)	Casiton
	10 mM	Tris/HCl (pH 7,6)
	1 mM	KPO <sub>4</sub> (pH 7,6)
	8 mM	MgSO <sub>4</sub>

Für CTT-Standardfestmedium wurden 1,5 % (w/v) Agar, für Top-Agar 0,75 % Agar (w/v) und für Medium zur Kontrolle der S-Motilität 0,5 % (w/v) Agar zugefügt.

---

<sup>1</sup>(SIGMA-Aldrich, F0518)

## Medienzusätze

Folgende Antibiotika wurden in der angegebenen Konzentration als Stocklösung im entsprechenden Lösungsmittel angesetzt (da die Arbeitskonzentrationen von den genutzten Bakterien abhängig sind, werden diese bei der Kultivierung in Abschnitt 2.2.1 aufgeführt):

Ampicillin	10 mg/ml in H <sub>2</sub> O
Chloramphenicol	10 mg/ml in 70 % EtOH
Gentamicin	1 mg/ml in H <sub>2</sub> O
Kanamycin	20 mg/ml in H <sub>2</sub> O
Spectinomycin	20 mg/ml in H <sub>2</sub> O
Streptomycin	10 mg/ml in H <sub>2</sub> O

Folgende Kohlenhydratlösungen wurden verwendet:

L(+)-Arabinose (im weiteren Text kurz Arabinose) wurde zu 20 % (w/v) in H<sub>2</sub>O angesetzt und in Konzentrationen von 0,01 - 0,1 % verwendet. D(+)-Glukose (kurz Glukose) wurde als Stocklösung zu 20 % (w/v) in H<sub>2</sub>O angesetzt und in einer Endkonzentration von 0,2 % eingesetzt. D(+)-Xylose (kurz Xylose) wurde zu 20 % (w/v) in H<sub>2</sub>O gelöst und in Konzentrationen von 0,03 - 0,3 % verwendet. D(+)-Galactose (kurz Galactose) wurde zu 25 % (w/v) in H<sub>2</sub>O angesetzt und dem Festmedium bei Bedarf in einer Konzentration von 1 % zugesetzt. D(+)-Saccharose (kurz Saccharose) wurde dem Festmedium bei Bedarf vor dem Autoklavieren in einer Endkonzentration von 3 oder 8 % zugefügt.

Weitere Medienzusätze waren:

Vanillinsäure wurde als 50 mM-Stocklösung in H<sub>2</sub>O angesetzt und in einer Endkonzentration von 0,5 mM verwendet. 2,6-Diaminopimelinsäure (DAP) wurde zu 60 mM in H<sub>2</sub>O gelöst und in einer Endkonzentration von 300 µM verwendet.

### 2.1.4 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden mit Hilfe von Vector NTI Advance™ 11 (Invitrogen, Deutschland) erstellt und über die Firmen Operon (Deutschland) oder SIGMA (Deutschland) bezogen. Eine Auflistung bietet Tabelle 5.1 im Anhang.

### 2.1.5 Plasmide

Die Konstruktion von Plasmiden erfolgte über Vector NTI Advance™ 11. Die Tabelle 5.2 im Anhang enthält alle für diese Arbeit verwendeten Vektoren und die erstellten Konstrukte.

## 2.1.6 Stämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Wildtypstämme waren *Caulobacter crescentus* CB15N (NA1000) [56], *Shewanella oneidensis* MR-1 [181] und *Myxococcus xanthus* DK1622 [94].

Für die Klonierung, zur Proteinproduktion und als Helferstamm bei der Konjugation wurden die in Tabelle 2.1 aufgeführten *Escherichia coli*-Stämme genutzt.

**Tabelle 2.1:** Verwendete *E. coli*-Stämme mit Genotyp

Stamm	Genotyp
TOP10 (Invitrogen)	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ <i>M15</i> $\Delta$ <i>lacX74</i> <i>nupG</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galE15</i> <i>galK16</i> <i>rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1</i> $\lambda$ <sup>-</sup>
Rosetta(DE3)pLysS (Novagen)	F <sup>-</sup> <i>ompT</i> <i>hsdS<sub>B</sub></i> ( <i>r<sub>B</sub></i> <sup>-</sup> <i>m<sub>B</sub></i> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> $\lambda$ (DE3 [ <i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i> ]) pLysSRARE (Cam <sup>R</sup> )
WM3064 <sup>1</sup>	<i>thrB1004 pro thi rpsL hsdS lacZ</i> $\Delta$ <i>M15</i> <i>RP4-1360</i> $\Delta$ ( <i>araBAD</i> )567 $\Delta$ <i>dapA1341::[erm pir(wt)]</i>

Die Tabelle 5.3 im Anhang enthält alle weiteren Stämme.

## 2.2 Mikrobiologische und zellbiologische Methoden

### 2.2.1 Kultivierung

Die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme - TOP10 (Streptomycin<sup>R</sup>; Invitrogen) zur Klonierung und Rosetta(DE3)pLysS (Chloramphenicol<sup>R</sup>; Novagen) für die heterologe Proteinproduktion - wurden bei 37 °C in LB-Medium angezogen. Für die Kultivierung des DAP-auxotrophen Stamms WM3064 wurde dem Medium 300  $\mu$ M 2,6-Diaminopimelinsäure (DAP) zugesetzt. Folgende Antibiotika wurden zur Selektion verwendet (Konzentrationen in  $\mu$ g/ml; flüssig/fest): Ampicillin (50/100), Chloramphenicol (20/30), Gentamicin (15/20), Kanamycin (30/50), Spectinomycin (50/100).

Die hier beschriebenen *C. crescentus*-Stämme sind alle abgeleitet vom synchronisierbaren Wildtypstamm CB15N (NA1000) [56]. Sie wurden bei 28 °C in PYE-Medium oder M2G-Minimalmedium angezogen [52]. Dem Medium wurden bei Bedarf folgende Antibiotika in entsprechender Konzentration ( $\mu$ g/ml; flüssig/fest) zugefügt: Chloramphenicol (1/1), Gentamicin (0.5/5), Kanamycin (5/25), Spectinomycin (25/50), Streptomycin (5/5). Für Phosphatmangelexperimente wurde ein Minimalmedium verwendet, das 20 mM Tris/HCl anstelle von Phosphatsalzen enthält (M2G<sup>-P</sup>-Medium).

*S. oneidensis* MR-1 [181] und die davon abgeleiteten Mutanten wurden bei 30 °C in LB-Medium kultiviert, wenn nötig unter Zugabe von 30  $\mu$ g/ml Kanamycin.

*M. xanthus* DK1622 [94] und die davon abgeleiteten Stämme wurden in CTT-Medium bei 32 °C angezogen [81]. Wenn erforderlich wurde dem Festmedium Kanamycin in einer

<sup>1</sup>W. Metcalf, University of Illinois, Urbana-Champaign (nicht veröffentlicht)

Konzentration von 50 µg/ml zugesetzt.

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch bei 600 nm (für *M. xanthus* bei 550 nm) bestimmt (OD<sub>600nm</sub> oder OD<sub>550nm</sub>).

### 2.2.2 Lagerung der Stämme

Kulturen auf Festmedium wurden bis zu 6 Wochen bei 4 °C gelagert. Ausnahme sind hier *M. xanthus*-Kulturen, die bei 18 °C bis zu 4 Wochen aufbewahrt werden konnten. Für die Langzeitlagerung wurden Suspensionskulturen mit 15 % DMSO versetzt und bei -80 °C eingefroren.

### 2.2.3 Schwärm-Platten

Um Stämme auf Bewegungsdefekte hin untersuchen zu können wurden Suspensionskulturen auf Festmedium mit niedriger Agar-Konzentration aufgetropft.

*C. crescentus*-Zellen wurden dafür in PYE-Medium auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,5 bis 0,9 angezogen. 2 µl der Kultur wurden auf PYE-Medium mit 0,3 % Agar und 0,2 % Glukose überführt und 24 h bei 28 °C inkubiert.

Um *M. xanthus* auf Bewegung hin zu untersuchen wurden die Zellen in CTT-Medium auf eine OD<sub>550nm</sub> von 0,5 bis 0,9 angezogen, geerntet und zu einer optischen Dichte von 7 (5 x 10<sup>9</sup> Zellen pro ml) in CTT-Medium aufgenommen. Von dieser ankonzentrierten Suspension wurden 5 µl auf eine frische Agar-Platte aus 0,5 % Casiton-CTT-Medium und 0,5 % Agar für S-Motilität oder 1,5 % Agar für A-Motilität aufgetropft. Die Morphologie der Kolonien wurde nach einer Inkubation von 24 h bei 32 °C mit Hilfe eines Leica MZ8 Stereomikroskops analysiert.

### 2.2.4 Synchronisation

Bei der Synchronisation von *C. crescentus*-Kulturen wurde sich die unterschiedliche Dichte der Stiel- und Schwärmerzellen zu Nutze gemacht [56].

Für geringe Ausbeuten, wie sie für die Mikroskopie ausreichend sind, wurden die Zellen bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,6 in 25 ml M2G-Minimalmedium angezogen und sedimentiert. Die Zellen wurden in 750 µl M2-Salzen resuspendiert und mit dem gleichen Volumen Percoll (SIGMA, Deutschland) gemischt. Nach Zentrifugation der Mischung für 20 min bei 11000 x g konnte eine Bande mit Schwärmerzellen abgenommen werden. Diese wurde in M2-Salzen gewaschen und in einem geringen Volumen (meist circa 100 µl) M2G-Minimalmedium aufgenommen.

War eine größere Ausbeute an Zellen erforderlich, wurde die Kultur in 1000 ml M2G-Minimalmedium bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,6 angezogen. Die Zellen wurden sedimentiert und in 150 ml M2-Salzen aufgenommen. Nach Zugabe von 50 ml Ludox (SIGMA, Deutschland) wurde die Suspension gemischt und für 30 min bei 6300 x g zentrifugiert. Die Bande mit Schwärmerzellen wurde abgenommen, zweimal in M2-Salzen gewaschen und in einem Volumen vorgewärmtem M2G-Medium aufgenommen, so dass die OD<sub>600nm</sub> bei 0,3 bis 0,4 lag.



Diese nur noch aus Schwärmerzellen bestehende Suspension konnte dann bei 28 °C kultiviert werden und in entsprechenden Intervallen Proben für die weitere Analyse gesammelt werden.

### 2.2.5 Mikroskopische Methoden

Für die Mikroskopie wurden 2 µl Zellkultur auf Objektträger (beschichtet mit 1 % Agarose in Wasser) aufgetropft und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Agarose wurde für Zeitrafferaufnahmen, bei denen *Caulobacter*-Zellen über einen längeren Zeitraum mikroskopisch untersucht wurden, in M2G-Medium gelöst. Hier wurden die Objektträger zusätzlich mit VLAP (Vaseline, Lanolin [Wollfett], Paraffin 1:1:1) versiegelt, um die Zellen vor dem Austrocknen zu schützen [88]. Mikroskopiert wurde mit einem 1000fach Plan-Apochromat Oil DIC Objektiv (numerische Apertur 1,40) an einem Zeiss AxioImager.M1 Mikroskop (Zeiss, Deutschland). Lichtmikroskopische Abbildungen der Zellen wurden mittels der Differentialinterferenzkontrast (DIC) -Methode aufgenommen. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde eine X-Cite®120PC Metallhalogenid-Lampe (EXFO, Kanada) zusammen mit den Filtern ET-DAPI, ET-DsRed (mRFP und mCherry), ET-GFP (eGFP) oder ET-YFP (eYFP und Venus) der Firma Chroma (USA) verwendet. Die Aufnahmen entstanden mit Hilfe einer Cascade®1K CCD-Kamera (Photometrics, USA), wobei die Steuerung des Mikroskops über das Programm MetaMorph® (Universal Imaging, USA) erfolgte.

Sollten Stämme mikroskopiert werden, in denen die Produktion der Fluoreszenzproteine durch einen induzierbaren Promotor gesteuert ist, wurden diese bei einer OD<sub>600nm</sub> von 0,2-0,3 mit dem entsprechenden Induktor versetzt und für eine Experiment-spezifische Zeitspanne kultiviert, bevor sie mikroskopisch analysiert werden konnten.

Der Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI; SIGMA, Deutschland) wurde verwendet um die DNA in *M. xanthus*-Zellen anzufärben, um die DNA (und somit die gesamte Zelle) in Immunfluoreszenz-Aufnahmen von *C. crescentus* zu markieren und um die Flagellen von *Caulobacter*-Zellen zu visualisieren. Die Färbung der DNA in *M. xanthus* wurde durch Inkubation der Zellsuspension mit 1 µg/ml DAPI für 10 min (schüttelnd) erreicht. Bei Verwendung während der Immunfluoreszenz wurde DAPI in einer Konzentration von 12,5 µg/ml der Sekundärantikörper-Lösung zugesetzt und ansonsten nach Protokoll (siehe unten) vorgegangen. Um die Flagellen von *C. crescentus*-Zellen zu visualisieren, wurden die Zellen mit 1,6 % Formaldehyd in 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,5) für 20 min fixiert und danach mit 1,5 µg/ml DAPI für 15 min inkubiert [102].

### Immunfluoreszenz

Um Proteine mittels Immunfluoreszenz detektieren zu können wurden 800 µl der Kultur bei einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5 abgenommen und die Zellen mit 2,5 % Formaldehyd in 30 mM NaPO<sub>4</sub> (pH 7,5) für 15 min fixiert. Nach einer Inkubationszeit von 40 min auf Eis wurden die Zellen dreimal in einem Volumen PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) gewaschen, in 100 µl GTE-Puffer (50 mM Glukose, 20 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 7,5) mit Zusatz von 1 µg/ml Lysozym (SIGMA, Deutschland) aufgenommen und auf Objektträger aufgetropft. Die verwendeten 8-Well-Objektträger (Thermo Scientific, USA)



wurden zuvor für 10 min mit Poly-L-Lysin Lösung (SIGMA, Deutschland) beschichtet und einmal mit Reinstwasser gewaschen. Die aufgetropften Zellen wurden für 10 min auf dem Objektträger inkubiert, verbliebene Flüssigkeit abgenommen und antrocknen gelassen. Zum Absättigen unspezifischer Bindungen wurden die auf dem Objektträger angetrockneten Zellen in 1 % BSA (bovines Serumalbumin; SIGMA, Deutschland) in PBS rehydriert und für 15 min in einer feuchten Kammer (zum Schutz vor dem Austrocknen) inkubiert. Nach dem Entfernen der Blocker-Lösung wurde der Erstantikörper in 1 % BSA in PBS zugegeben und für 1 h in der feuchten Kammer inkubiert. Die spezifischen Antikörper gegen BacA und BacB wurden in einer Verdünnung von 1:50 verwendet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Objektträger zehnmal mit PBS gewaschen und der Sekundärantikörper in 1 % BSA in PBS hinzugefügt. Als Zweitantikörper wurde in den hier vorgestellten Experimenten ein Alexa Fluor 594 Goat Anti-Rabbit Antikörper (Invitrogen, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:300 verwendet. Zusammen mit dem Sekundärantikörper wurden 12,5 µg/ml 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 1 h in der feuchten Kammer wurde der Objektträger acht mal mit PBS und zweimal mit dem Equilibrierungspuffer aus dem SlowFade® Antifade Kit (Invitrogen, Deutschland) gewaschen. Zum Schutz vor dem Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe wurden die Zellen mit SlowFade® Antifade (Invitrogen, Deutschland) überschichtet und danach mit einem Deckglas bedeckt. Um das Präparat vor dem Austrocknen zu schützen wurde der Objektträger mit Nagellack versiegelt.

Untersuchungen zur Ultrastruktur von Zellen mittels Kryoelektronentomographie wurden in Kooperation mit Ariane Briegel und Grant Jensen (Division of Biology, California Institute of Technology, Pasadena, USA), elektronenmikroskopische Aufnahmen von gereinigten Proteine mit Hilfe von Erhard Mörschel (Laboratorium für Zellbiologie FB17, Philipps-Universität Marburg) durchgeführt.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Konstruktion der Plasmide

Die Konstruktion von Plasmiden erfolgte über Vector NTI Advance™ 11. Die Tabelle 5.2 im Anhang enthält alle für diese Arbeit verwendeten Vektoren und die erstellten Konstrukte.

**Plasmide für Fusionen an Fluoreszenzmarker oder eine TEM-1  $\beta$ -Lactamase:** Für die Konstruktion von Plasmiden, die einfach homolog in das Genom integrieren und dort eine durch Zugabe von Vanillinsäure oder Xylose induzierbare Fusion einfügen, wurde das zu untersuchende Gen in voller Länge über eine Polymerasekettenreaktion (PCR) mit spezifischen Oligonukleotiden amplifiziert (für Fusionen an das 3'-Ende des Gens wurde das Stop-Codon entfernt) mit den passenden Restriktionsendonukleasen geschnitten und in einen entsprechend behandelten Vektor ligiert. Hierfür verwendete Vektoren waren: pVVENN-4, pXCHYC-1, pXCHYC-2, pXCFPC-2, pXVENC-2, pXVENN-1 und pXblaMC-2.

**Plasmide zur Überproduktion:** Um Proteine unter Kontrolle eines durch Zugabe von Arabinose oder Xylose induzierbaren Promotors verstärkt in einer Zelle zu produzieren, wurden im Zielorganismus selbst-replizierende Plasmide verwendet. Das Gen des zu untersuchenden Proteins wurde in voller Länge mittels PCR amplifiziert, mit den passenden Restriktionsendonukleasen geschnitten und in einen entsprechend behandelten Vektor ligiert. Für die Konstruktion von Plasmiden mit Fluoreszenzmarker wurde die Fusion aus spezifischem Gen und dem Gen für ein Fluoreszenzprotein mit Hilfe eines wie zuvor beschrieben erstellten Plasmids für eine induzierbare Fluoreszenzfusion als Matrize amplifiziert und entsprechend weiter behandelt.

Verwendete Vektoren waren: pBAD24, pBAD24CB, pBXMCS-2 und pBXMCS-6.

**Plasmide zum Ersetzen nativer Gene:** Zur Konstruktion von Plasmiden, die eine *in-frame* Deletion im Zielorganismus ermöglichen, wurde die Sequenz der das entsprechende Gen umgebenden Region (die ersten 12 Codons des Gens, sowie weitere circa 600 Basenpaare in 5'-Richtung; ebenso wurde für das 3'-Ende verfahren) amplifiziert, mit Restriktionsendonukleasen geschnitten und über eine Dreifragmentligation in einen entsprechend behandelten Vektor eingesetzt.

Das Erstellen von Plasmiden zum Ersetzen des nativen Gens im Chromosom durch ein Fusionsgen verlief nach einem ähnlichem Schema. Die Sequenz des Gens inklusive eines am 3'-Ende daran fusionierten Fluoreszenzmarkers wurde aus einem wie oben beschrieben erstellten Plasmid amplifiziert. Zusätzlich wurde eine Region bestehend aus circa 600 Basenpaaren *downstream* des Gens vervielfältigt. Beide Fragmente wurden mit Restriktionsendonukleasen behandelt und in einen passenden Vektor ligiert.

Sollte später statt der Fluoreszenzfusion eine an den Hämagglutinin (HA) -Affinitätsmarker fusionierte Version des Gens gegen das endogene Gen ausgetauscht werden wurde das Gen für die Fluoreszenzfusion aus dem Plasmid geschnitten und durch ein HA-Fragment ersetzt (aufgrund der geringen Größe der Sequenz für HA konnten dafür dimerisierte Oligonukleotide verwendet werden).

Die als Basis genutzten Vektoren waren pNPTS138, pNPTS138 R6KT und pKO1Km.

**Plasmide für die Proteinaufreinigung:** Um Gene heterolog für eine spätere Proteinaufreinigung in *E. coli* exprimieren zu können, wurde die Sequenz der Gene in voller Länge per PCR amplifiziert, das Produkt mit Restriktionsendonukleasen behandelt und in einen pET-Vektor kloniert. Diese Vektoren ermöglichen bei Verwendung geeigneter *E. coli*-Stämme (hier: Rosetta(DE3)pLysS) die Expression von Genen über einen T7-Promotor und die Fusion eines für Affinitätsaufreinigungen nutzbaren Markers (in diesem Fall Hexahistidin).

Anmerkung: Da eine Expression des nativen CC3022 in *E. coli* nicht möglich war wurde die Sequenz des *Caulobacter*-Gens für *E. coli* codon-optimiert (Sequenz siehe Tabelle 2.2) und durch die Firma GenScript (USA) synthetisiert.

Für die Konstruktion verwendete Vektoren waren: pET21a und pET28a.

Zur Konstruktion des Plasmids für die Reporterfusion des *pstC*-Promotors siehe Abschnitt 2.3.16

**Tabelle 2.2:** Sequenz des codon-optimierten CC3022-Gens, welches zur Aufreinigung von BacB genutzt wurde

1	ATGTTTGCAA	AGAAAAAAGA	AACCCCGGCA	AAACTGGCGC	TGACCCCGCT	GGAACCGCAG
61	CGTGCAGCAA	CCCCGCAGGT	TGCACAGCCG	CAGCCGCAGC	CGGCACCGGC	GCCGGCGCGC
121	CCGAAACCGG	CGAGCCTGAT	TGCGCAGGGT	CTGACCATTG	GCGGCGATGT	TGTTGGCGAT
181	ATCGAAGTTC	ATCTGGATTG	TGTGGTTATG	GGTGATGTTA	AAGTGGGCAA	ACTGATTGTG
241	GGTCCGAATG	CGCGTATTGA	AGGTGCCGTG	GTTGCACAGG	CGATGGAAAT	CCATGGTATG
301	GTGATCGGTG	CAGTTACCGC	ACAGAGCGTT	CGTCTGTACG	GTACGGCACG	CGTGGATGGT
361	GATATCACCC	ATGAACAGCT	GGCAATGGAA	CCGGGTGCGG	AATTCAGGG	CCGTAGTCTG
421	AAATTCCGCC	GTCCGGCACC	GACCCCGCAG	CCGGGTCAGC	AGGCACCGGC	CGCGCCGACG
481	CCGGCGGCAC	CGCCGACCCC	GCCGTCTGCG	AGCCAGACCC	CGTATAATCA	TAGCGCGCAC

### 2.3.2 DNA-Präparation aus Bakterienzellen

Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde mit Hilfe des GenElute™ Plasmid Kit (SIGMA, Deutschland) nach den Herstellerangaben extrahiert. Die chromosomale DNA aus *C. crescentus*, die als Matrize für die Amplifikation per PCR diente, wurde unter Verwendung des illustra™ bacteria genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare, Deutschland) isoliert. Die Konzentration und Reinheit der DNA wurde mit Hilfe des Nanodrop ND-1000 Spektralphotometers (Nanodrop, USA) ermittelt. Für DNA-Präparationen zur Kontrolle einer Insertion in *M. xanthus* wurde Zellmaterial von Festmedium in Lyse and Go PCR Reagent (Thermo Scientific, USA) für 10 min auf 95 °C erhitzt, abgekühlt und durch Zentrifugation von Zellresten befreit.

### 2.3.3 DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde die aufgereinigte Nukleinsäure in einer Konzentration von 50-100 µg/ml unter Angabe der zu verwendenden Oligonukleotide an die Firma Eurofins MWG Operon (Deutschland) versendet. Die erhaltenen Sequenzen wurden mittels Vector NTI Advance™ 11 (Invitrogen, Deutschland) ausgewertet.

### 2.3.4 Polymerasekettenreaktion

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde das Enzym KOD Hot Start Polymerase (Merck, Deutschland) in Kombination mit den vom Hersteller bereitgestellten Lösungen unter Zugabe von 1 mM MgSO<sub>4</sub> und 5 % DMSO genutzt. Als Matrize wurde chromosomale DNA verwendet. Die eingesetzten Oligonukleotide hatten eine Konzentration von 0,5 µM. Tabelle 2.3 zeigt das für die PCR verwendete Thermoprofil.

**Tabelle 2.3:** Standard-PCR-Programm für KOD-Polymerase

Schritt	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	95 °C	2 min	
Denaturierung	95 °C	30 s	30 Zyklen
Anlagerung der Oligonukleotide	65 °C	30 s	
Verlängerung	72 °C	30 s pro kb	
Finale Verlängerung	72 °C	4 min	

PCR-Produkte wurden unter Verwendung des GenElute™ PCR Clean-Up Kit (SIGMA, USA) oder mit Hilfe eines präparativen Agarosegels und GenElute™ Gel Extraction Kit (SIGMA, USA) aufgereinigt.

Zur Kontrolle der Aufnahme eines Plasmids oder der korrekten Insertion eines DNA-Fragmentes in die Zellen wurde eine sogenannte Kolonie-PCR durchgeführt. Hierfür wurde eine Taq-Polymerase verwendet, die in einem fertigen Mix mit Puffer, MgSO<sub>4</sub> und DNA-Ladepuffer vorliegt (BioMix Red; Bioline, Deutschland). Zu dieser Mischung wurden die spezifischen Oligonukleotide in einer Konzentration von 0,5 µM und 5 % DMSO hinzugefügt. Als Matrize für die PCR dienten ganze Zellen, die mit dem fertigen Ansatz gemischt wurden. Nur für eine Kolonie-PCR mit *M. xanthus*-Stämmen musste die DNA zuvor mit Lyse and Go PCR Reagent (Thermo Scientific, USA) isoliert werden.

Das Thermoprofil für die Kolonie-PCR zeigt Tabelle 2.4.

**Tabelle 2.4:** Standard-PCR-Programm für Taq-Polymerase (BioMix)

Schritt	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	94 °C	2 min	
Denaturierung	94 °C	30 s	35 Zyklen
Anlagerung der Oligonukleotide	65 °C	30 s	
Verlängerung	72 °C	60 s pro kb	
Finale Verlängerung	72 °C	4 min	

### 2.3.5 Agarosegelelektrophorese

Nukleinsäurefragmente wurden mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese in 0,5-fach TAE-Puffer (20 mM Tris, 0,175 % Essigsäure, 0,5 mM EDTA) ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Der Agarose wurde zur Visualisierung der DNA Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,05 % (v/v) zugefügt. Zehnfach DNA-Probenpuffer (50 % Glycerin, 0,2 % Bromphenolblau, 0,2 % Xylencyanol, 0,2 M EDTA) wurde mit den Proben 1:10 gemischt. Die aufgetragenen Nukleinsäuren wurden anschließend bei 10 V pro cm<sup>2</sup>-Gel aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Agarosegele in einem UV-Transilluminator (UVP-BioDoc-IT™ Imaging System, UniEquip, Deutschland) analysiert. DNA-Fragmente wurden mittels GenElute™ Gel Extraction Kit (SIGMA, USA) aus Agarosegelen isoliert.

### 2.3.6 Restriktion und Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Restriktion wurden 2-5 µg DNA mit den gewünschten Endonukleasen und dem vom Hersteller empfohlenen Puffer gemischt und für 4-12 h inkubiert. Inkubationszeit und Temperatur sowie der Zusatz von 0,1 mg/ml BSA richteten sich nach den Anforderungen der verwendeten Enzyme. Zur Dephosphorylierung wurde dem Restriktionsansatz von Vektoren SAP (*shrimp alkaline phosphatase*; Fermentas, Kanada) zugefügt. Aufgereinigt wurden die DNA-Fragmente über das GenElute™ PCR Clean-Up Kit (SIGMA, USA) oder mit Hilfe eines präparativen Agarosegels und GenElute™ Gel Extraction Kit (SIGMA, USA).

Für die Ligation wurde die T4-DNA-Ligase zusammen mit dem *Rapid Ligation Buffer* der Firma Fermentas (Kanada) verwendet. Für die Reaktion wurde die dreifache Menge an zu inserierendem Fragment mit Vektor gemischt, Puffer und Ligase zugefügt und für 30-60 min bei Raumtemperatur inkubiert.

### 2.3.7 Herstellen chemisch kompetenter *E. coli*

Hier wurde das Protokoll von Sambrook [151] in modifizierter Version verwendet. In Kürze: Eine Übernachtskultur wurde in 250 ml LB-Medium angeimpft und bei 37 °C kultiviert, bis eine OD<sub>600nm</sub> von 0,6 erreicht war. Die Zellen wurden für 10 min auf Eis inkubiert, sedimentiert und in 15 ml eiskaltem 0,1 M CaCl<sub>2</sub> aufgenommen. Nach einer weiteren Inkubation auf Eis für 30 min wurden die Zellen sedimentiert und in 4 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub> mit 15 % Glycerin aufgenommen. Die Zellen wurden in 150 µl -Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren oder direkt für eine Transformation verwendet. Die Lagerung von kompetenten Zellen erfolgte bei -80 °C.

### 2.3.8 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Für die Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurde die Suspension auf Eis aufgetaut und 10 µl Ligationsansatz hinzugefügt. Diese Mischung wurde für 30 min auf Eis inkubiert, für 90 s auf 42 °C erhitzt und darauf wieder für 5 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium wurden die Zellen für 30-60 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert und danach auf LB-Festmedium mit dem erforderlichen Antibiotikum ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden Einzelklone auf frisches Festmedium überführt, und die Aufnahme der DNA wurde mittels Kolonie-PCR überprüft.

### 2.3.9 Herstellen elektrokompetenter *C. crescentus*

Zur Herstellung kompetenter *Caulobacter*-Zellen wurde die entsprechende Kultur in zweifach konzentriertem PYE-Medium bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 1,0 angezogen. Die Zellen wurden sedimentiert und zweimal im gleichen Volumen kalter 10 % Glycerin-Lösung gewaschen. Für den dritten Waschschrift wurden die Zellen in 1/10 Volumen 10 % Glycerin aufgenommen, sedimentiert und final in einem Volumen von 1/50 des Ausgangsvolumens resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden in 80 µl -Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren oder direkt für eine Transformation verwendet. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -80 °C.

### 2.3.10 Transformation elektrokompetenter *C. crescentus*

Für die Elektroporation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und mit einer geeigneten Menge DNA gemischt. Bei Plasmiden, die einfach homolog in das Genom integrieren sollten, wurde eine Menge von 0,5 bis 2,0 µg Plasmid-DNA eingesetzt, während bei replizierenden Plasmiden nur 0,1 bis 0,3 µg verwendet wurden. Diese Mischung wurde in eine sterile Elektroporationskuvette überführt und mit 1,5 kV, 400 Ω und 25 µF elektroporiert. Anschließend wurden die

Zellen in 900 µl zweifach PYE-Medium aufgenommen und 1-3 h bei 28 °C schüttelnd inkubiert. Nach dieser Zeitspanne wurden die Zellen auf PYE-Festmedium mit dem zur Selektion benötigten Antibiotikum ausplattiert. Bei integrierenden Plasmiden wurden pro Platte 250 µl Zellsuspension ausplattiert, wohingegen bei Transformation mit replizierenden Plasmiden 2,5, 20 und 100 µl einer 1:100 verdünnten Kultur verwendet wurden. Nach einer Inkubation von 2 bis 3 Tagen bei 28 °C wurden Einzelklone auf frisches PYE-Festmedium überführt und die Aufnahme der DNA mittels Kolonie-PCR überprüft.

Zur Konstruktion von *in-frame* Deletionsstämmen wurden Derivate des Plasmids pNPTS138 (M.R. Alley, nicht publiziert) verwendet. Dieses Plasmid beinhaltet, neben einer Kanamycin-Resistenzkassette zur Selektion, die Sequenz des *sacB*-Gens zur Gegenselektion. Die durch *sacB* codierte Levansaccharase hydrolysiert Saccharose zu Glukose und Fruktose und bildet aus den dabei freigesetzten Fruktosylresten Polymere (sogenanntes Levan). Da *C. crescentus* dieses Levan nicht abbauen kann, lysieren Zellen mit funktionellem *sacB*-Gen bei Zugabe von Saccharose. 500-600 bp große Regionen direkt *up*- und *downstream* des entsprechenden Zielgens wurden mittels PCR amplifiziert und zusammen in pNPTS138 ligiert. Die Zellen wurden nach dem Standardprotokoll elektroporiert und auf Selektivmedium kultiviert. Nach erfolgter Integration des Plasmids in das Chromosom wurden Einzelkolonien in PYE-Medium ohne Antibiotikum angezogen um eine zweite Rekombination zu ermöglichen. 2 µl dieser Kulturen wurden auf PYE-Festmedium mit Zusatz von 3 % Saccharose ausplattiert, um für Klone zu selektieren, die kein Plasmid mehr trugen. Zellen mit erfolgter zweiter Rekombination, das heißt Saccharose-resistente aber Kanamycin-sensitive Klone, wurden mittels Kolonie-PCR auf korrekte Deletion getestet.

### 2.3.11 Transduktion von *C. crescentus*

Die Transduktion von *C. crescentus*-Zellen wurde nach dem Protokoll von Ely [52] durchgeführt. Hierfür wurde ein Phagenlysate der Kultur hergestellt, von der die DNA übertragen werden sollte. Die Zellen wurden dabei mit einer Präparation von ΦCr30 (>1000 PFU/ml) für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, mit PYE-Softagar gemischt, danach auf Festmedium verteilt und über Nacht bei 28 °C inkubiert. Der Softagar wurde nach Zugabe von PYE-Medium mit einer Pipette gelöst und die Suspension über Nacht bei Raumtemperatur geschwenkt. Das Gemisch wurde am folgenden Tag mit 100 µl Chloroform versetzt und für 10 s gevortext. Nicht gelöster Agar und Zellrückstände wurden bei 4600 x g sedimentiert und der Überstand wurde noch einmal mit Chloroform gemischt und für 10 s gevortext. Das so gewonnene Phagenlysate wurde für die Transduktion im UV-Crosslinker mit 120 mJ/cm<sup>2</sup> inaktiviert. Um nun die DNA auf einen Empfängerstamm zu übertragen wurde dieser in PYE-Medium angezogen und mit 1/10 Volumen inaktiviertem Phagenlysate für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen auf PYE-Festmedium mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.



### 2.3.12 Transformation elektrokompetenter *M. xanthus*

*M. xanthus*-Stämme wurden in CTT-Medium bis zu einer  $OD_{550nm}$  angezogen und durch Zentrifugation für 10 min bei 4600 x g geerntet. Die Zellen wurden dreimal in sterilem Wasser gewaschen, in einem geringen Volumen Wasser aufgenommen und direkt für die Elektroporation eingesetzt. Dafür wurden die Zellen mit 0,5 - 1,5 µg Plasmid-DNA gemischt, in eine sterile Elektroporationsküvette überführt und mit 650 V, 25 µF und 400 Ω elektroporiert. Nach Zugabe von 1 ml CTT-Medium wurden die Zellen in ein steriles Plastikgefäß transferiert und schüttelnd für 5 h bei 32 °C inkubiert. Aliquots von 50, 200 und 500 µl Kultur wurden mit CTT-Top-Agar gemischt. Diese Suspension wurde zum Übersichten von CTT-Festmedium mit entsprechendem Antibiotikum verwendet. Nach Inkubation von 5-10 Tagen wurden Einzelkolonien auf frisches CTT-Festmedium überführt.

Für *in-frame* Deletionen in *M. xanthus* wurde die Technik von Ueki [175] verwendet. 500-600 bp große Fragmente der die Zielgene flankierenden Regionen wurden über PCR amplifiziert und in pKO1Km ligiert. *M. xanthus*-Zellen wurden nach dem Standardprotokoll elektroporiert, wobei die Integration der verwendeten Plasmide eine Kanamycin-Resistenz vermittelt. Des weiteren trugen die Plasmide als Gegenselektionsmarker das *galK*-Gen, welches für die Galactokinase aus *E. coli* codiert. Dieses Enzym überführt Galactose in die phosphorylierte Form, die von *M. xanthus* nicht metabolisiert werden kann und in der Zelle zu toxischen Mengen akkumuliert. Kanamycin-resistente Einzelkolonien wurden in CTT-Medium ohne Selektionsmarker angezogen, mit CTT-Top-Agar gemischt und auf CTT-Festmedium mit 1 % Galactose ausplattiert. Kanamycin-sensitive aber Galactose-resistente Klone wurden mittels Kolonie-PCR auf die Deletion hin überprüft.

### 2.3.13 Transformation von *S. oneidensis* über Konjugation

Die Transformation von *S. oneidensis* erfolgte mit Hilfe des *dap*<sup>-</sup> Helferstamms *E. coli* WM3064 (W Metcalf, nicht publiziert).

Ein SO1662-Deletionsstamm wurde wie zuvor beschrieben konstruiert [104], so dass nur die 5' und 3'-terminalen 12 Codons des nativen Gens im Chromosom verblieben. Dafür wurde WM3064 mit dem pNPTS138-Derivat pJK27 transformiert und in LB-Medium unter Zusatz von 300 µM 2,6-Diaminopimelinsäure (DAP) und dem entsprechenden Antibiotikum (Kanamycin) angezogen. Die Zellen aus 1 ml dieser Kultur sowie 1 ml einer MR-1-Kultur wurden geerntet und dreimal in LB-Medium mit 300 µM DAP gewaschen. Für die Konjugation wurden die Kulturen in 250 µl LB-Medium mit 300 µM DAP vereinigt, auf LB-Festmedium mit 300 µM DAP auf getropft und über Nacht bei 32 °C inkubiert. Die Zellen wurden am Folgetag mit LB-Medium abgeschwemmt und um das DAP zu entfernen dreimal in LB-Medium gewaschen. Anschließend wurden verschiedene Volumina der Suspension (100, 50, 10, 5 und 1 µl) auf LB-Festmedium mit Kanamycin als Selektionsmarker ausplattiert. Einzelkolonien wurden in LB-Medium ohne Antibiotika angezogen und auf LB-Festmedium mit Zusatz von 8 % Saccharose transferiert. Saccharose-resistente, Kanamycin-sensitive Klone wurden durch Kolonie-PCR überprüft.

### 2.3.14 RNA-Präparation aus *C. crescentus*

Für die Transkriptom-Analyse mittels Microarray wurde die RNA aus *C. crescentus*-Zellen isoliert. Hierfür wurden 10 bis 26 ml Zellsuspension verwendet, bei Kultivierung in PYE-Medium wurden die Zellen bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,2 bis 0,3 angezogen.

Vor der Arbeit mit RNA wurden alle Flächen mit der RNase inaktivierenden Lösung RNase-ExitusPlus™ (AppliChem, Deutschland) behandelt. Es wurden nur sterile und RNase-freie Plastik-Gefäße und Spitzen genutzt.

Um die RNA zu stabilisieren und experimentell bedingte Änderungen der Genexpression zu minimieren, wurden die Kulturen vor der RNA-Extraktion mit RNAProtect Bacteria Reagent (Qiagen, Deutschland) behandelt. Dazu wurden die Zellkulturen in ein Gefäß, das das zweifache Volumen an RNAProtect Bacteria Reagent beinhaltet, überführt, 5 s gevortext und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 5000 x g und 4 °C sedimentiert und in 1 ml TRIzol® Reagent (Invitrogen, Deutschland) pro 1 x 10<sup>7</sup> Bakterienzellen aufgenommen. Zur Lyse der Zellen wurde die Lösung mehrfach auf- und abpipettiert und danach für 10 min bei 65 °C im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform pro 1 ml TRIzol® Reagent wurde die Lösung von Hand durch schütteln gemischt und für 5 min schwenkend bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Überführen der Lösung in mit Wachs beschichtete Gefäße (Phase Lock Gel Heavy Tubes; 5 PRIME, bezogen über VWR, Deutschland) wurden die wässrige und Phenol-haltige Phase mittels Zentrifugation für 15 min bei 12000 x g und 4 °C getrennt. Die wässrige Phase wurde abgenommen und die RNA mittels PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen, Deutschland) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

Um noch vorhandene genomische DNA aus der RNA-Präparation zu entfernen, wurden die Proben mit dem TURBO DNA-free™ Kit (Ambion, bezogen über Applied Biosystems, Deutschland) behandelt. Auch hier wurde nach Herstellerangaben verfahren.

Um den vollständigen Abbau der chromosomalen DNA zu prüfen, wurde eine PCR mit Oligonukleotiden zur Amplifikation eines 600 Basenpaare großen Fragments, welches im Genom *upstream* von CC0183 liegt ist, durchgeführt. Bei erfolgter DNase-Behandlung konnte kein spezifisches Produkt im Agarosegel detektiert werden.

Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde mit Hilfe des Nanodrop ND-1000 Spektralphotometers (Nanodrop, USA) ermittelt. Zur Kontrolle der Qualität der RNA wurden die Proben zusätzlich auf ein Agarosegel geladen. Hierfür wurde ein kleines Volumen RNA-Präparation mit zweifach RNA Loading Dye (Fermentas, Kanada) gemischt und für 10 min bei 70 °C inkubiert. Die Proben wurden kurz auf Eis gekühlt und danach mittels konventioneller Gelelektrophorese analysiert.

Anmerkung: Mit einem solchen Agarosegel kann auch eine Verunreinigung mit chromosomaler DNA detektiert werden.



### 2.3.15 Microarray

Die Transkriptionsregulation in *C. crescentus*-Zellen als Antwort auf einen Mangel an Phosphat im umgebenden Medium stand im Fokus der Microarray-Experimente. Hierfür wurde die RNA aus verschiedenen Stämmen, kultiviert in Komplexmedium (PYE-Medium) oder in einem Phosphat-freien Medium (M2G<sup>-P</sup>-Minimalmedium), isoliert (genaue Auflistung der Proben siehe Tabelle 2.5). Die Proben zur Transkriptionsregulation durch den in den ersten Analysen identifizierten Transkriptionsregulator CC3677 wurden in einem zweiten, unabhängigen Experiment untersucht.

Alle Proben wurden zweimal, an unterschiedlichen Tagen isoliert, um biologische Replikate zu erhalten. Die RNA wurde an die Firma febit (Deutschland) versendet, die alle weiteren Experimente, das Chip-Design, die Datenerfassung und die Analyse der Rohdaten (einschließlich Normalisierung) übernahm. Die verwendeten Biochips beinhalteten 15000 Merkmale (inklusive Kontrollen und Leerwerte). Für jeden im *Caulobacter*-Genom (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=177>) codierten ORF (offenen Leserahmen) wurden 3 spezifische Sonden direkt auf dem Array synthetisiert. Zusätzlich wurden Sonden für kleine, nicht-codierende RNAs [103] erstellt.

Die erhaltenen Daten wurden mit Hilfe des Programms Acuity 4.0 (Axon instruments, USA) nach Genen durchsucht, deren Expression um mindestens das Zweifache reguliert wurde, das heißt, die eine log<sub>2</sub>-Ratio von <-1 oder >+1 zwischen zwei Proben aufwiesen.

**Tabelle 2.5:** Proben für die Transkriptionsanalyse

Probe	Stamm	Bedingung
1.1	CB15N	exponentiell in PYE-Medium wachsend
1.2	CB15N $\Delta phoB$ <i>vanA::P<sub>van-phoB</sub></i> (JK61)	exponentiell in PYE-Medium wachsend
1.3	CB15N $\Delta pstS\Omega$ <i>vanA::P<sub>van-pstS</sub></i> (JK161)	exponentiell in PYE-Medium wachsend
1.4	CB15N	1 h in M2G <sup>-P</sup> kultiviert
1.5	CB15N $\Delta phoB$ <i>vanA::P<sub>van-phoB</sub></i> (JK61)	1 h in M2G <sup>-P</sup> kultiviert
1.6	CB15N	2,5 h in M2G <sup>-P</sup> kultiviert
1.7	CB15N $\Delta phoB$ <i>vanA::P<sub>van-phoB</sub></i> (JK61)	2,5 h in M2G <sup>-P</sup> kultiviert
1.8	CB15N	6 h in M2G <sup>-P</sup> kultiviert
1.9	CB15N $\Delta phoB$ <i>vanA::P<sub>van-phoB</sub></i> (JK61)	6 h in M2G <sup>-P</sup> kultiviert
1.10	CB15N ( $\Delta phoB$ <i>vanA::P<sub>van-phoB</sub></i> (JK61)	6 h in M2G <sup>-P</sup> 50 mM Vanillinsäure kultiviert
1.11	CB15N $\Delta pstS\Omega$ <i>vanA::P<sub>van-pstS</sub></i> (JK161)	exponentiell in PYE-Medium wachsend 1 h mit 50 mM Vanillinsäure induziert
1.12	CB15N $\Delta pstS\Omega$ <i>vanA::P<sub>van-pstS</sub></i> (JK161)	exponentiell in PYE-Medium 50 mM Vanillinsäure wachsend
2.1	CB15N	exponentiell in PYE-Medium wachsend
2.2	CB15N	6 h in M2G <sup>-P</sup> kultiviert
2.3	CB15N $\Delta CC3677$ (JK206)	exponentiell in PYE-Medium wachsend
2.4	CB15N $\Delta CC3677$ (JK206)	6 h in M2G <sup>-P</sup> kultiviert

### 2.3.16 Bestimmung der Promotoraktivität mittels $\beta$ -Galactosidase-Assay

Zur Analyse der Aktivität eines PhoB-abhängigen Promotors in *C. crescentus*-Zellen wurde ein 400 Basenpaare großes Fragment der Sequenz *upstream* von *pstC* (CC0290), einschließlich der ersten 12 Codons des Gens, mit spezifischen Oligonukleotiden amplifiziert und in den Vektor pPR9TT [154] ligiert. pPR9TT ist ein in *C. crescentus* replizierendes Plasmid, welches eine Fusion des *lacZ*-Gens an die Sequenz von Interesse ermöglicht. Ein mit dem konstruierten Plasmid (pJK18) transformierter Stamm konnte so mittels  $\beta$ -Galactosidase-Assay auf die Aktivität des *pstC*-Promotors untersucht werden. Zu testende Kulturen wurden in PYE-Medium angezogen und für 20 min auf Eis gelagert. Anschließend wurde die OD<sub>600nm</sub> bestimmt. In einem Glasgefäß wurden 900 µl frisch angesetzter Z-Puffer (60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 1 mM Natrium- $\beta$ -mercaptoethansulfonat) und 50 µl Chloroform vorgelegt und zum Schluss mit 100 µl Kultur gemischt. Die Suspension wurde für exakt 10 s gevortext und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid (ONPG)-Lösung (4 mg/ml ONPG in Z-Puffer) wurden die Proben kurz gevortext und bei Raumtemperatur inkubiert, bis eine gelbliche Verfärbung sichtbar wurde. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 µl 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> abgestoppt und die Absorption bei 420 und 550 nm bestimmt.

Zur Berechnung der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Miller Units} = 1000 * (\text{OD}_{420\text{nm}} - 1,75 * \text{OD}_{550\text{nm}}) / (t * V * \text{OD}_{600\text{nm}})$$

wobei t die Inkubationszeit nach Zugabe der ONPG-Lösung in min und V das Volumen der Kultur, also in diesem Fall 0,1 ml ist.

Um die Induktion des *pstC*-Promotors nach Überführen der Zellen auf M2G<sup>-P</sup>-Medium untersuchen zu können, wurde die Kultur in PYE-Medium angezogen und 1:20 in M2G<sup>-P</sup>-Medium verdünnt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben genommen und nach dem Standardprotokoll analysiert, wobei aufgrund der geringen OD<sub>600nm</sub> der Kulturen mit dem doppelten Volumen an Zellsuspension gearbeitet wurde.

## 2.4 Biochemische Methoden

### 2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Analyse von gereinigten Proteinen, die Kontrolle der heterologen Proteinproduktion in *E. coli* oder als Ausgangspunkt für Western Blot-Untersuchungen wurden Protein-haltige Proben über denaturierende SDS-(*sodium dodecyl sulfate*) Polyacrylamidgele [101] aufgetrennt. Die Proben wurden in zweifach SDS-Probenpuffer (125 mM Tris, 20 % (v/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS, 200 mM Dithiothreitol, 0,001 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8) gelöst und für 10 min auf 95 °C erhitzt. Zur Größenbestimmung wurde PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas, Kanada) aufgetragen. Die Gele wurden mit Hilfe der PerfectBlue™ Vertikalen

Doppelkammersysteme Twin S (Peglab, USA) gegossen (Zusammensetzung siehe Tabelle 2.6), und die Elektrophorese wurde bei 15-30 mA pro Gel in SDS-Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS) durchgeführt. Die Elektrophorese wurde gestoppt, wenn die blaue Lauffront das Ende des Trenngels erreichte.

**Tabelle 2.6:** Zusammensetzung eines 11%igen Sammel- und eines 5%igen Trenngels

Komponente	Trenngel (5 ml)		Sammelgel (2,5 ml)	
	Volumen	Endkonzentration	Volumen	Endkonzentration
Wasser	1,9 ml	-	1,43 ml	-
1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)	1,25 ml	375 mM	-	-
0,4 % (w/v) SDS		0,1 %		
0,5 M Tris/HCl (pH 6,8)	-	-	625 µl	125 mM
0,4 % (w/v) SDS				0,1 %
30 % Rotiphorese® NF-Acrylamid/Bis-Lösung (29:1)	1,9 ml	11%	417 µl	5%
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, 1,2-Bis(dimethylamino)-ethan)	3 µl	0,06%	1,9 µl	0,075%
10 % (w/v) APS (Ammoniumperoxodisulfat)	40 µl	0,08%	25 µl	0,1%

## 2.4.2 Färben von SDS-Gelen

Zum Färben der aufgetrennten Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen wurden die Gele für mindestens 30 min schwenkend in Coomassie-Lösung (40 % Methanol, 10 % Essigsäure, 0,1 % (w/v) Brilliant Blue R 250) inkubiert. Um Proteine zu visualisieren, wurden die Gele darauf in Entfärber (20 % Ethanol, 10 % Essigsäure) inkubiert, bis die Hintergrundfärbung ausreichend reduziert war.

Für die Detektion von geringen Proteinmengen in SDS-Polyacrylamidgelen wurde eine Silberfärbung verwendet. Hierfür wurden die Gele zweimal für mindestens 15 min in 10 % Essigsäure und 40 % Ethanol fixiert, für 30 bis 60 min in Sensibilisierungslösung (30 % Ethanol, 2 g/l Natriumthiosulfat, 68 g/l Natriumacetat) geschwenkt und viermal für 5 min mit Reinstwasser gewaschen. Nach Inkubation in einer 0,25 %igen Silbernitratlösung für 20 min und zweimaligem Waschen in Reinstwasser wurde das Gel so lange in Entwicklerlösung (2,5 % Natriumcarbonat, 0,015 % Formaldehyd) geschwenkt, bis Proteinbanden sichtbar wurden. Die Reaktion wurde durch Inkubation in 14,6 g/l Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) für 10 min abgestoppt, und das Gel wurde noch dreimal in Reinstwasser gewaschen.

### 2.4.3 Western Blot

Proben für eine Analyse mittels Immunblot wurden durch Sedimentation von Flüssigkulturen und Aufnahme der Zellen in SDS-Probenpuffer zu einer optischen Dichte von 10 angefertigt. Diese Proben wurden für 10 min auf 95 °C erhitzt und auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die für den Proteintransfer verwendete Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran wurde durch 15 s Inkubation in Methanol aktiviert, in Wasser gewaschen und für mindestens 5 min in Western Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 10 % Methanol) equilibriert. Der Transfer erfolgte mit einem PerfectBlue™ Semi-Dry-Elektroblotter (PeqLab, USA) bei 2 mA pro cm<sup>2</sup>-Membran für 1,5 bis 2 h. Zum Absättigen unspezifischer Bindestellen wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in 2,5 % Milchpulver in TBST (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1 % (w/w) Tween 20, pH 7,5) geschwenkt. Die Detektion der Proteine erfolgte durch Inkubation mit spezifischen Antikörpern (Verdünnungen siehe Tabelle 2.7) in 2,5 % Milchpulver in TBST für 2 h bei Raumtemperatur. Danach wurde die Membran dreimal in TBST gewaschen. Als Sekundärantikörper wurde ein HRP (*horseradish peroxidase*, Meerrettichperoxidase)-gekoppelter Antikörper gegen Kaninchen-IgG (goat anti-rabbit; Perkin Elmer, USA) in einer Verdünnung von 1:20000 eingesetzt. Auch diese Antikörperlösung wurde in 2,5 % Milchpulver in TBST angesetzt und für 2 h bei Raumtemperatur auf der Membran inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran in TBST wurde eine Chemilumineszenz-Lösung (Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus; Perkin Elmer, USA) auf der Membran verteilt und diese für 1 min geschwenkt. Die Signale wurden durch Belichten eines Amersham Hyperfilm™ ECL -Chemilumineszenzfilms (GE Healthcare, Deutschland) oder - wenn eine quantitative Auswertung gewünscht war - mit Hilfe des LAS-4000 Luminescent Image Analyzer (Fujifilm, Deutschland) detektiert.

**Tabelle 2.7:** Für Immunblots verwendete Antikörper

Antikörper	eingesetzte Verdünnung	Bemerkung/ Referenz
$\alpha$ -CtrA	1:10000	[47]
$\alpha$ -BacA	1:10000	generiert durch Immunisierung von Kaninchen mit den Peptiden CATPAEPARRAPPKV und CGRSLKFQRPAPAPSQ
$\alpha$ -BacB	1:5000	generiert durch Immunisierung von Kaninchen mit dem Peptid CPQPQPAPAPARPKPA
$\alpha$ -PbpC	1:10000	generiert durch Immunisierung von Kaninchen mit den Peptiden CVAPAPGQPPPDNLPLY und LPPYKFDDGKSPGEPC
$\alpha$ -SpmX	1:50000	[140]
$\alpha$ -CC0170	1:10000	generiert durch Immunisierung von Kaninchen mit dem Peptid DSNGRETELPRDLRL

### 2.4.4 Zellfraktionierung

Die subzelluläre Lokalisation von Proteinen wurde mittels Fraktionierung getestet. Hierfür wurden *C. crescentus*-Zellen in PYE-Medium bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,7 angezogen, geerntet

und in 10 ml 50 mM Piperazin-N-N'-bis(2-ethansulfonsäure) (PIPES, pH 6,5) aufgenommen. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Nach dem Auftauen der Suspension auf Eis wurden 0,05 mg/ml DNase, 0,1 mg/ml Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 1 mM MgCl<sub>2</sub> und eine Spatelspitze Lysozym zugefügt und für 10 min schwenkend bei Raumtemperatur inkubiert. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten bei 4 °C. Die Zellen wurden mittels drei French Press-Passagen bei 16000 psi aufgeschlossen und grobe Partikel sowie nicht aufgebrochen Zellen durch Zentrifugation für 10 min bei 5000 x g sedimentiert. Das so erhaltene Zellysat wurde für 30 min bei 236000 x g zentrifugiert, um die Membranen von löslichen Bestandteilen des Zytoplasmas zu trennen. Die sedimentierten Membranen wurden mit 50 mM PIPES (pH 6,5) abgespült (nicht resuspendiert) und noch einmal unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nach diesem Waschschrift wurden die Membranen mit Hilfe eines Teflon-Glas-Homogenisators (VWR, Deutschland) in 1 ml frisch angesetztem 100 mM NaCO<sub>3</sub> aufgenommen [124]. Um assoziierte Proteine vollständig von den Membranen zu lösen, wurde die Suspension 1 h schwenkend inkubiert und die Membranen durch Zentrifugation für 30 min bei 236000 x g sedimentiert. Die Membranen wurden zum Waschen in 50 mM PIPES (pH 6,5) aufgenommen und noch einmal zentrifugiert.

Von den verschiedenen Fraktionen wurden Proben genommen, mit SDS-Probenpuffer gemischt und über ein SDS-Polyacrylamidgel und anschließenden Western Blot analysiert.

### 2.4.5 Anreicherung von Proteinen aus dem Überstand einer Suspensionskultur

Die Abgabe von Proteinen in das umgebende Medium (sei es durch Sekretion oder die Bildung von Vesikeln) wurde durch Sedimentieren der Zellen und Ankonzentrierung der Bestandteile im Überstand getestet. Dafür wurden die *C. crescentus*-Zellen im entsprechend zu untersuchenden Medium kultiviert und sedimentiert. Der erhaltene Überstand wurde durch einen Filter mit einer PVDF-Membran einer Porengröße von 0,45 µm (Millipore, Deutschland) filtriert und mit Hilfe von Amicon®-Konzentratoren (regenerierte Zellulose, 3000 MWCO, Millipore, Deutschland) bis auf ein Volumen von circa 1 ml eingengt. Die Proteine wurden durch Zugabe von 10 % Trichloressigsäure für 3 h auf Eis gefällt, durch Zentrifugation sedimentiert und dreimal mit 100 % Ethanol gewaschen. Das Präzipitat wurde in einer Vakuum-Konzentrationszentrifuge (UNIVAPO 100H, Uniequip, Deutschland) getrocknet. Zur Visualisierung der Proteine wurde das Sediment in SDS-Probenpuffer aufgenommen und auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach dem Auftrennen der Proteine mittels Elektrophorese wurde das Gel einer Silberfärbung unterzogen.

### 2.4.6 Isolation von Membranvesikeln aus dem Kulturüberstand

Um sekretierte, lösliche Proteine von mit Hilfe von Vesikeln abgegebenen Proteinen unterscheiden zu können, wurde der Kulturüberstand nach Sedimentation der Zellen und Filtration nicht durch die Verwendung von Konzentratoren eingengt, sondern enthaltene Membranen

direkt durch Ultrazentrifugation für 1 h bei 200000 xg sedimentiert. Die so isolierten Membranvesikel wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach dem Auftrennen der Probe mittels Elektrophorese wurde ein Western Blot angeschlossen, und Membranproteine wurden mit Hilfe von spezifischen Antikörpern detektiert.

### 2.4.7 Heterologe Überexpression in *E. coli*

Für die Produktion von Proteinen in *E. coli* wurde der Stamm Rosetta(DE3)pLysS verwendet. Dieser Stamm besitzt das Gen für die T7 RNA-Polymerase unter Kontrolle eines Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)-induzierbaren Promotors sowie ein Plasmid mit Genen für seltene tRNAs. Die Zellen wurden mit Derivaten der pET-Plasmide (Novagen, Deutschland) transformiert, die eine Fusion mit dem Hexahistidin-Affinitätsmarker ermöglichten, und bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 1 angezogen. Nach Induktion mit 0,5 mM IPTG wurden die Zellen für 3 h bei 37 °C weiter kultiviert, sedimentiert, einmal in Puffer A1 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8) gewaschen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Die Proteinproduktion wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und anschließender Coomassie-Färbung kontrolliert.

### 2.4.8 Proteinaufreinigung

Für die Aufreinigung von **CC1873** wurden Zellen verwendet, die mit dem Plasmid pMT879 (CC1873-His6) transformiert waren. 7,5 g Zellen wurden in 75 ml Puffer A2 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, pH 8) zusammen mit 10  $\mu$ g/ml DNase I und 100  $\mu$ g/ml Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) gelöst und durch zwei French Press-Passagen bei 16000 psi aufgebrochen. Nach Entfernen von groben Partikeln durch Zentrifugation für 30 min bei 20000 xg wurde das Zelllysats mit 8 ml Ni-NTA Agarose-Matrix (Qiagen, Deutschland), die zuvor in Puffer A2 equilibriert worden war, gemischt. Die Suspension wurde für 1 h schwenkend inkubiert und das Ni-NTA-Säulenmaterial durch Zentrifugation für 5 min bei 2000 xg sedimentiert. Nach viermaligem Waschen in je einem Volumen Puffer A3 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, pH 8) wurde das Säulenmaterial in 24 ml Puffer A4 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, 1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, pH 8) aufgenommen. Diese Suspension wurde für 15 min schwenkend inkubiert, um gebundenes Protein von der Matrix zu eluieren. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und die Elution noch einmal wiederholt. Die vereinigten Überstände wurden über Nacht gegen 3 l Puffer A5 (50 mM NaPO<sub>4</sub>, 5 mM Mg<sub>2</sub>Cl, 0,1 mM EDTA, 1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, pH 7) mit 50 mM NaCl dialysiert. Diese Lösung wurde auf eine zuvor mit Puffer A5 plus 50 mM NaCl equilibrierte HiPrep 16/10 SP FF Kationenaustauschersäule (GE Healthcare, Deutschland) geladen. Die Säule wurde mit 75 ml Puffer A5 (versetzt mit 50 mM NaCl) gewaschen und das Protein mit 250 ml eines linearen NaCl-Gradienten (50-500 mM in Puffer A4) eluiert. Die Fraktionen mit gereinigtem CC1873 wurden vereinigt und gegen 3 l Puffer A6 (50 mM HEPES/NaOH, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EDTA, 10 % Glycerin,



1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, pH 7,2) dialysiert. Diese Lösung wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Um **CC3022** anzureichern, wurde ein Stamm verwendet, der zuvor mit pJK83 (codon-optimiertes CC3022-His6) transformiert worden war. Der Zellaufschluss und die Aufreinigung über Ni-NTA-Affinitätschromatographie wurden entsprechend dem Protokoll für CC1873 durchgeführt. Danach wurde das Protein gegen Puffer A5 mit 10 mM NaCl dialysiert. Nach dem Entfernen des Präzipitats wurde die Lösung auf eine zuvor mit Puffer A5 plus 50 mM NaCl equilibrierte HiPrep 16/10 SP FF Kationenaustauschersäule (GE Healthcare, Deutschland) geladen. CC3022 wurde mit 250 ml eines linearen NaCl-Gradienten (50-500 mM in Puffer A4) eluiert und die Protein-beinhaltende Fraktion direkt für die Elektronenmikroskopie verwendet.

**MXAN4636**-Polymere wurden mittels Niedriggeschwindigkeitszentrifugation aus Zelllysaten separiert. Für die Aufreinigung wurde ein Stamm verwendet, der ein Plasmid zur Überexpression von MXAN4636-His6 (pSW17) trug. Hier wurden 6,5 g Zellen in 32,5 ml Puffer A2 gelöst und durch zwei French Press-Passagen bei 16000 psi aufgeschlossen. Das so entstandene Lysat wurde für 15 min bei  $3350 \times g$  zentrifugiert, was zur Sedimentation von MXAN4636-Polymeren als trübe, viskose Phase am Boden des Gefäßes führte. Der Überstand dieser Phase wurde vorsichtig abgenommen und die mit MXAN4636 angereicherte Fraktion in 40 ml Puffer A3 gelöst. Nach einer Inkubation von 15 min (schwenkend) wurde die Suspension für 15 min bei  $3350 \times g$  zentrifugiert. Auch hier wurde wieder der Überstand entfernt und die trübe, MXAN4636-enhaltende Phase wurde gesammelt und in 15 ml Puffer A4 aufgenommen. Zum Waschen wurde die Lösung zweimal schwenkend für 15 min inkubiert und die MXAN4636-Polymere wie zuvor sedimentiert. Final wurde die MXAN4636-enhaltende Phase in 10 ml Puffer A4 aufgenommen und gegen 2 l Puffer A6 (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 10 % Glycerin, 1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, pH 8) dialysiert. Die Proteinlösung wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die Proteine **MXAN4635**, **MXAN4637** und **MXAN7475** wurden unter denaturierenden Bedingungen aus Einschlusskörperchen isoliert. Die dabei verwendeten Stämme waren mit pSW20 (His6-MXAN4635), pMT983 (MXAN4637-His6) oder pMT984 (MXAN7475-His6) transformiert. Es wurden jeweils 6,5 g Zellen in 26 ml Puffer A2 resuspendiert und durch zwei French Press Passagen bei 16000 psi aufgeschlossen. Die unlöslichen Proteine wurden durch Zentrifugation für 20 min bei  $20000 \times g$  sedimentiert und in 30 ml Puffer B1 (100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM Tris, 8 M Harnstoff, 0,05 % Tween 20, pH 6,3) aufgenommen. Nach Inkubation für 15 min wurde die Lösung 20 min bei  $10000 \times g$  zentrifugiert und der Überstand mit 4 ml Ni-NTA Agarose-Säulenmaterial (Qiagen, Deutschland) gemischt. Die Suspension wurde für 60 min schwenkend inkubiert und darauf mit 16 ml Puffer B1 gewaschen. Eluiert wurde das Protein erst mit 8 ml Puffer B2 (Puffer B1 mit einem pH-Wert von 5,9) und danach mit 12 ml Puffer B3 (Puffer B1 mit einem pH-Wert von 4,5). Fraktionen mit gereinigtem Protein wurden gesammelt und bis zur weiteren Verwendung bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert.

MXAN4635 (2,5 mg/ml) und MXAN4637 (2,3 mg/ml) wurden durch schrittweises Entfernen von Harnstoff bei Raumtemperatur in ihre natürliche Konformation zurückgefaltet. Dafür wurden die Lösungen mit denaturierten Proteinen sukzessive gegen Puffer B2 (100 mM



NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris, 0,5 % Triton X 100, pH 8,0) mit 4 M, 2 M, 1 M und ohne Harnstoff dialysiert. Die Rückfaltung von MXAN7475 (0,6 mg/ml) wurde nach dem gleichen Protokoll aber mit Puffern ohne Zusatz von Detergenz erreicht. In allen Fällen kam es nach der Renaturierung zu spontaner Polymerbildung.

Proteinkonzentrationen wurden mittels eines modifizierten Bradford-Assay (Roti-Nanoquant Reagent; Carl Roth, Deutschland) mit einer Verdünnungsreihe von bovinem Serumalbumin (BSA; New England Biolabs) als Standard gemessen. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Für BacA wurden die Ergebnisse durch eine Bestimmung der Proteinkonzentration mit Hilfe einer Bicinchoninsäure (BCA) Reaktion (BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit; Thermo Scientific, USA) und durch eine quantitative Aminosäureanalyse, durchgeführt durch die Firma Alphalyse A/S (Dänemark), verifiziert.

### 2.4.9 Sedimentationstest

Als Beleg für die *in vitro*-Polymerisation von Bactofilinen wurde ein Sedimentationstest durchgeführt. Hierfür wurde BacA über Nacht gegen Puffer LS (10 mM HEPES/NaOH, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EDTA, 1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, pH 7,2), wenn erforderlich ergänzt mit 100 mM oder 300 mM KCl, dialysiert. Die Proteinlösung wurde für 1 h bei 435000 x g zentrifugiert und Proben des Überstands und des Sediments mittels SDS-PAGE analysiert. Die Proteinbanden wurden durch Färbung mit Coomassie visualisiert.

Zur Ermittlung der minimalen für die Polymerbildung erforderlichen Proteinkonzentration wurde BacA (1 mg/ml) zu verschiedenen Konzentrationen in Puffer LS oder Puffer LS mit 300 mM KCl gelöst. Nach einer Equilibrierung von 60 h bei 4 °C wurden die Lösungen für 1 h bei 435000 x g zentrifugiert. Proben des Überstands und des Sediments wurden in äquivalenten Volumen aufgenommen und mittels SDS-PAGE analysiert. Die Proteine wurden durch Silberfärbung visualisiert.

### 2.4.10 Co-Immunpräzipitation und Massenspektrometrie

Für die Co-Immunpräzipitation wurden *Caulobacter*-Zellen in M2G-Minimalmedium bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,6 angezogen, zum Vernetzen der Proteine mit 0,6 % Formaldehyd versetzt und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Glycin in einer Endkonzentration von 125 mM und Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur gestoppt. Die Zellen wurden geerntet, zweimal mit 200 ml Puffer C1 (50 mM NaPO<sub>4</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4) gewaschen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

1,3 g Zellen wurden auf Eis aufgetaut, in 100 ml Puffer C2 (20 mM HEPES/NaOH, 100 mM NaCl, 20 % Glycerin, 0,5 % Triton X 100, pH 7,4) gewaschen und in 10 ml Puffer C2 aufgenommen. Der Suspension wurden 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mg/ml Lysozym, 5  $\mu$ g/ml DNase I und 100  $\mu$ g/ml Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) zugesetzt, wonach die Mischung für 30 min auf Eis inkubiert wurde. Nach Aufschluss der Zellen durch zwei French Press-Passagen bei 16000 psi wurden grobe Partikel durch Zentrifugation für 5 min bei 13000 x g entfernt. Jeweils

2 ml des Zelllysats wurden mit 20 µl (für BacA-HA) oder 80 µl (für BacB-HA) in Puffer C2 equilibriertem EZview™ Red Anti-HA Affinity Gel (Sigma, Deutschland) gemischt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurden die Proben auf einem Rotator mit Drehteller gelagert, um eine gute Durchmischung der Suspension zu erreichen. Das Affinitätsmaterial wurde durch Zentrifugation für 2 min bei 8000 x g sedimentiert, zweimal für 5 min mit 750 µl Puffer C2, dreimal für 5 min mit 750 µl Puffer C3 (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 % Triton X 100, pH 7,5) und dreimal für 5 min mit 750 µl Puffer C4 (100 mM Tris/HCl, 750 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,05 % Triton X 100, pH 8,0) gewaschen.

Zur Elution der Proteine wurde die Suspension in 100 µl SDS-Probenpuffer ohne reduzierende Reagenzien (Standard-SDS-Probenpuffer ohne Zusatz von Dithiothreitol) aufgenommen und für 15 min bei 95 °C inkubiert, um die durch die Verwendung von Formaldehyd entstandenen Vernetzungen zu lösen. Danach wurde die Affinitätsmatrix sedimentiert und der Überstand auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Proteine wurden durch Silberfärbung visualisiert und nach dem Ausschneiden der entsprechenden Banden aus dem Gel durch *Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight* Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) in Kolaboration mit Jörg Kahnt (Department of Ecophysiology, Max-Planck-Institut Marburg) identifiziert [93].

## 2.5 Bioinformatische Methoden

Alle Nukleotid- oder Proteinsequenzen wurden über NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>) bezogen und mittels der Blastn- oder Blastp-Algorithmen von NCBI sowie mit Hilfe des SMART-Algorithmus (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) ausgewertet. Vorhersagen zur Lokalisation von Proteinen wurden mittels SignalP, TMHMM (beides <http://www.cbs.dtu.dk/services/>) und PSORTb (<http://www.psort.org/psortb/>) getroffen, Proteinalignments mit Hilfe von Clustal X (<http://www.clustal.org/>) erstellt. Für die Identifikation von Lipoproteinen wurde die DOLOP-Datenbank (<http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/genomes/dolop/>) und zur Vorhersage von Sekundärstrukturen APSSP2 (<http://www.imtech.res.in/raghava/apssp2/>) verwendet. Zur Analyse der Verbreitung von Bactofilin-Homologen wurde die Pfam-Datenbank (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) genutzt. Die Verteilung der Homologe über die verschiedenen Spezies wurde mittels iTOL (<http://itol.embl.de>) dargestellt.

Die Ausarbeitung einer Consensus-Sequenz für die Pho-Box erfolgte über die MEME Suite. Dabei wurde eine Matrix aus den fünf in *C. crescentus* bekannten Pho-Boxen erstellt. Die vier nicht konservierten Nukleotide in der Mitte wurden dabei mit den für *Caulobacter* spezifischen Wahrscheinlichkeiten von 32,6 % für C oder G sowie 17,4 % für A oder T angegeben (siehe Abschnitt 5.3). Die Suche nach den entsprechenden Motiven im Genom von *C. crescentus* CB15 (mit einem  $p$ -Wert  $< e^{-4}$ ) erfolgte über FIMO (*find individual motif occurrences*). Beide Programme sind über [http://meme.nbcr.net/meme4\\_3\\_0/intro.html](http://meme.nbcr.net/meme4_3_0/intro.html) zugänglich.

Die Analyse der Microarray-Daten erfolgte über Acuity 4.0 (Axon instruments, USA).

Das Erstellen von Oligonukleotidsequenzen und Vektorkarten sowie die Auswertung von Sequenzierungsdaten erfolgte mittels Vector NTI Advance™ 11 (Invitrogen, Deutschland).

Die Aufnahme und Bearbeitung/ Auswertung von Fotos am Fluoreszenzmikroskop erfolgte über MetaMorph® (Universal Imaging, USA), die Analyse quantitativer Western Blots mittels MultiGauge (Fujifilm, Deutschland).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Charakterisierung Polymer-bildender Proteine in Bakterien

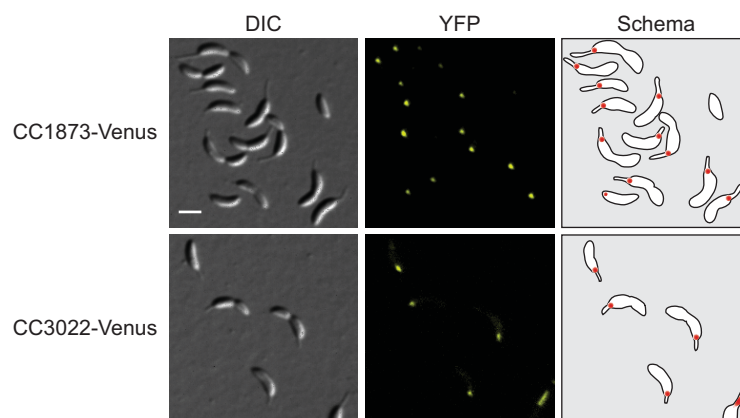
Im ersten Teil dieses Kapitels sollen die Experimente zur Identifizierung und Charakterisierung der Bactofiline in Bakterien erläutert werden. Ausgangspunkt war die Suche nach Proteinen, die an der Polmorphogenese im  $\alpha$ -Proteobakterium *Caulobacter crescentus* beteiligt sind. Nach einer Vorauswahl wurden zwei geeignete Kandidaten über Lokalisationsstudien verifiziert und es konnte gezeigt werden, dass beide Proteine *in vivo* und *in vitro* polymere Strukturen ausbildeten und an der Rekrutierung einer Peptidoglykansynthase zum bestielten Pol beteiligt waren.

Durch Sequenzvergleiche konnten homologe Proteine in weiteren Bakterienspezies ausgemacht werden. Erste Untersuchungen in Organismen verschiedener Klassen konnten unter anderem aufzeigen, dass die Fähigkeit zur Polymerisation ein gemeinsames Kennzeichen der Bactofiline ist.

#### 3.1.1 Identifikation und Lokalisation von Bactofilin-Homologen in *C. crescentus*

*C. crescentus* dient aufgrund der charakteristischen asymmetrischen Zellteilung als Modellorganismus für Studien der Zellzyklusregulation in Bakterien. Bei der Teilung entstehen zwei morphologisch und physiologisch unterschiedliche Zellen: die sessile Mutterzelle (bestielte Zelle) und eine frei bewegliche Schwärmerzelle. Letztere trägt ein einzelnes Flagellum und mehrere Typ IV-Pili an einem Pol. Während der Differenzierung einer Schwärmerzelle zur Stielzelle wird das Flagellum abgeworfen, die Pili werden eingezogen und am gleichen Pol entsteht die Prostheka. Erst wenn dieser Teil der Entwicklung abgeschlossen ist, kann die Zelle das Chromosom replizieren und eine neue Zellteilung initiieren.

Um Faktoren zu identifizieren, die an der Pol-Morphogenese und Differenzierung beteiligt sind, wurde gezielt nach Genen gesucht, die in der Zeitspanne des Schwärmer-zu-Stielzellen-Übergangs reguliert werden. Hier konnte auf Daten einer Studie zur Transkriptionsregulation in *C. crescentus* während des Zellzyklus zurückgegriffen werden [105]. Aus der Gruppe der zu diesem Zeitpunkt induzierten Gene wurden offene Leserahmen (ORFs) gewählt, die für nicht charakterisierte Proteine codierten. Die Kandidaten wurden mit dem Gen, welches für das gelb fluoreszierende Protein Venus codiert, fusioniert und ektopisch unter Kontrolle eines Xylose-induzierbaren Promotors exprimiert [121]. Die so entstandenen *C. crescentus*-Stämme wurden



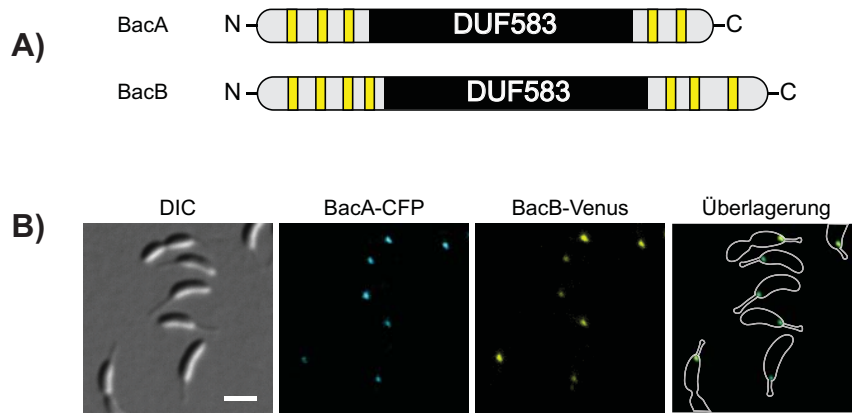
**Abbildung 3.1:** Lokalisation von CC1873 und CC3022. Verteilung der Fusionsproteine CC1873- und CC3022-Venus in der Zelle. Die Stämme MT256 (*xytX::P<sub>xyt</sub>-CC1873-venus*) und MT250 (*xytX::P<sub>xyt</sub>-CC3022-venus*) wurden in PYE-Medium angezogen, für 1 h mit 0,03 % Xylose induziert und mittels DIC- und Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Das Schema verdeutlicht das Lokalisationsmuster der beiden Proteine. Balken: 2 µm.

auf polare Fluoreszenzsignale hin untersucht. Dabei konnten die bis dahin nicht beschriebenen Proteine CC1873 und CC3022 identifiziert werden (Abbildung 3.1).

CC1873 (im Folgenden als BacA bezeichnet) besitzt eine molekulare Masse von 16,8 kDa, wohingegen CC3022 (BacB) mit einer Masse von 24,3 kDa annotiert ist. Western Blot-Analysen mit spezifischen Antikörpern gegen BacB zeigten ein Signal für ein kleineres Protein (Daten nicht gezeigt). Da der Leserahmen für CC3022 ein potentiell zweites (*downstream*) Startcodon aufwies, wurde ein entsprechend N-terminal verkürztes Protein in *C. crescentus* produziert und die Signale von Wildtypprotein und verkürztem Protein wurden im Western Blot verglichen (Daten nicht gezeigt). Beide Proteine ließen sich auf der gleichen Höhe detektieren, so dass das zweite Startcodon im Leserahmen CC3022 den Beginn der Translation markiert, was zu einem 18,8 kDa großen Protein führt. Für alle im weiteren Verlauf vorgestellten Experimente wurde diese kurze Form von BacB verwendet. Datenbankrecherchen ergaben, dass BacA und BacB paraloge Proteine mit einer Sequenzähnlichkeit von 67 % sind. Beide weisen eine konservierte Domäne unbekannter Funktion (DUF583) auf, die von kurzen, Prolin-reichen terminalen Sequenzen flankiert wird (Abbildung 3.2A).

Um die subzelluläre Lokalisation von BacA und BacB untersuchen zu können, wenn beide unter Kontrolle ihres natürlichen Promotors stehen, wurde ein Stamm konstruiert, bei dem die endogenen Gene durch *bacA-ecfp* und *bacB-venus* ersetzt wurden (JK34). Die fluoreszenzmikroskopische Analyse dieses Stamms konnte für beide Fusionsproteine eine Lokalisation am bestielten Pol nachweisen, während keine spezifischen Signale in Schwärmerzellen detektierbar waren (Abbildung 3.2B). Diese Ergebnisse bestätigen das Lokalisationsmuster der Proteine aus Abbildung 3.1.

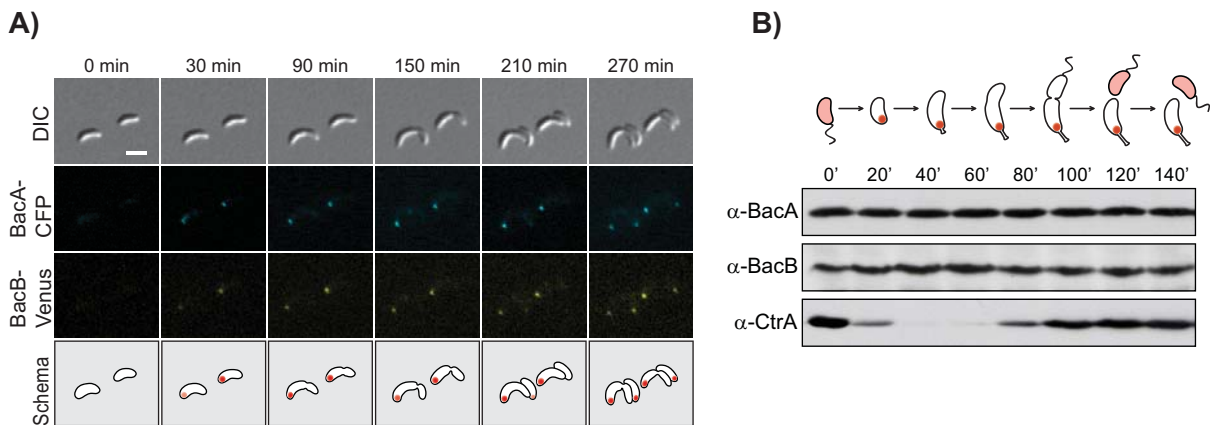
Die Abwesenheit von polaren Fluoreszenzsignalen in Schwärmerzellen lässt auf eine dynamische Lokalisation von BacA und BacB schließen. Um dies nachweisen zu können, wurden Zeitrafferaufnahmen von synchronisierten Zellen des Stamms JK34 angefertigt, wodurch sich die subzelluläre Verteilung der beiden Proteine über den Verlauf des Zellzyklus beobachten lässt. Die Schwärmerzellen wurden mittels Dichtezentrifugation isoliert, auf einen mit einem



**Abbildung 3.2:** Aufbau und Lokalisation von BacA und BacB. **A)** Schematische Abbildung von BacA und BacB. Die Position der Domäne DUF583 ist in Schwarz dargestellt, die Prolin-reichen Abschnitte in Gelb. **B)** Lokalisation von BacAB *in vivo*. Zellen des Stammes JK34 (*bacA-ecfp bacB-venus*) wurden in PYE-Medium angezogen und mittels DIC- und Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Balken: 2 µm.

Agarosekissen beschichteten Objektträger aufgetropft und auf ihre Differenzierung hin mikroskopisch analysiert. Abbildung 3.3A zeigt, dass beide Bactofilin-Paralogue in Schwärmerzellen delokalisiert sind und während des Schwärmer-zu-Stielzellen-Übergangs am bestielten Pol akkumulieren. Die dabei entstehenden polaren Signale überdauern die folgenden Entwicklungsstadien der Zellen und sind auch nach der Teilung in der Stielzelle nachweisbar.

Da sich die Abwesenheit von polaren Signalen in Schwärmerzellen durch zeitlich regulierte Lokalisation, aber auch durch Proteinbiosynthese oder Proteinabbau erklären lässt, wurde die Menge an BacA und BacB in synchronisierten Wildtypzellen im Verlauf des Zellzyklus

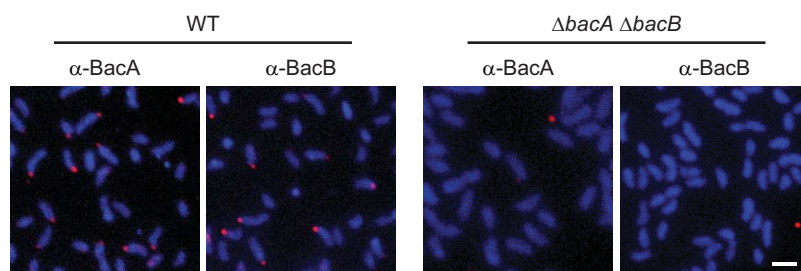


**Abbildung 3.3:** Zellzyklus-abhängige Lokalisation und Proteinmenge von BacAB. **A)** Subzelluläre Lokalisation von BacA und BacB im Laufe des Zellzyklus. Schwärmerzellen des Stammes JK34 (*bacA-ecfp bacB-venus*) wurden auf einem mit Agarose beschichteten Objektträger aufgebracht ( $t=0$ ), und ihre Entwicklung wurde mittels DIC- und Fluoreszenzmikroskopie beobachtet. Das Schema verdeutlicht die ermittelte Lokalisation der Proteine. Balken: 2 µm **B)** Zellzyklus-abhängige Proteinmenge von BacA und BacB. Schwärmerzellen des Wildtypstammes CB15N wurden in M2G-Medium transferiert und über die Länge eines Zellzyklus hinweg inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und mittels Western Blot unter Verwendung von Antikörpern gegen BacA, BacB und CtrA analysiert. Die Analyse der Proteinmenge des Zellzyklusregulators CtrA dient als Kontrolle für die Synchronisation [47]. Das Schema illustriert die Morphologie von *C. crescentus* und die subzelluläre Verteilung von BacA und BacB zu verschiedenen Zeiten der Entwicklung.



bestimmt. Dazu wurden Schwärmerzellen aus einer gemischten Kultur isoliert und in frisches Medium überführt. Anschließend wurden während ihres Entwicklungszyklus alle 20 min Proben für einen Western Blot abgenommen. Das Ergebnis dieser Analysen war, dass beide Proteine in Schwärmerzellen wie auch in Stielzellen nachweisbar sind, wobei die Proteinmenge im Laufe der zellulären Differenzierung konstant bleibt (Abbildung 3.3B). Daraus lässt sich schließen, dass die Proteine BacA und BacB zwar in der Schwärmerzelle vorhanden sind, aber erst während der Entwicklung zur Stielzelle an den Pol rekrutiert werden.

Um sicher zu stellen, dass die Fusion eines Fluoreszenzproteins keinen Einfluss auf die Lokalisation von BacA und BacB hat, wurde die subzelluläre Verteilung beider Proteine mittels Immunfluoreszenz bestätigt. Hierfür wurden Wildtyp-*C. crescentus*-Zellen (CB15N) und Zellen eines Deletionsstammes ( $\Delta bacAB$ ; JK5) mit spezifischen Antikörpern gegen BacA oder BacB inkubiert und die Signale eines Alexa-Fluor594-gekoppelten Sekundärantikörpers im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen. Auch hier konnten im Wildtyp polare Signale in vielen Zellen detektiert werden, wohingegen in JK5 keine spezifischen Signale sichtbar waren (Abbildung 3.4).



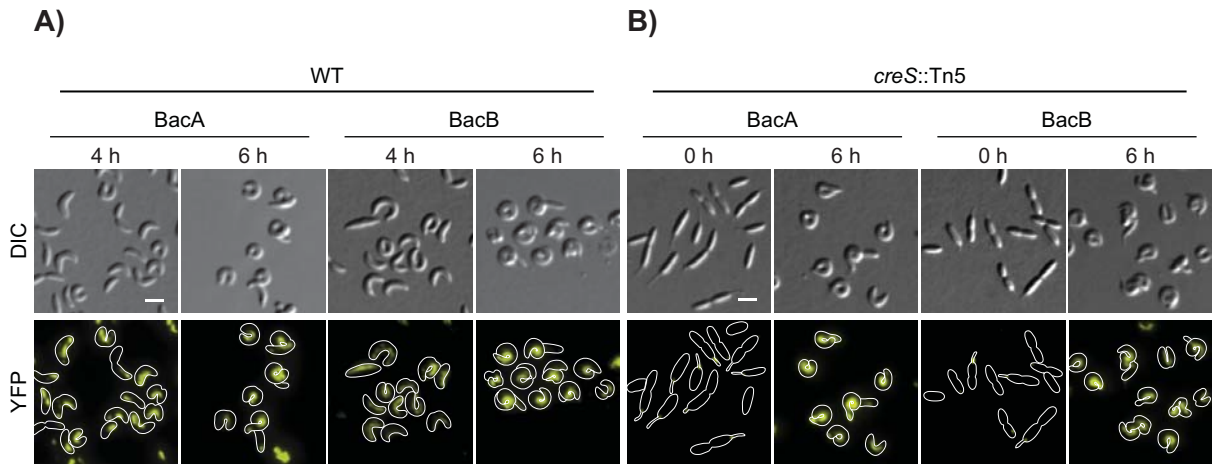
**Abbildung 3.4:** Kontrolle der Lokalisation von BacAB mittels Immunfluoreszenz. Fixierte Zellen der Stämme CB15N (Wildtyp) und JK5 ( $\Delta bacAB$ ) wurden mit spezifischen Antikörpern gegen BacA oder BacB behandelt. Die Lokalisation wurde daraufhin mit einem Alexa-Fluor594-gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen. Um die einzelnen Zellen darstellen zu können, wurde die DNA mittels 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt. Die gezeigten Bilder sind Überlagerungen der Alexa-Fluor594- und DAPI-Signale. Balken: 2  $\mu$ m.

### 3.1.2 Bactofilin bilden Membran-assoziierte polymere Strukturen

Einen ersten Hinweis auf die Funktion von BacA und BacB in der Zelle ergaben Experimente, in denen die beiden Proteine unter Kontrolle eines Xylose-induzierbaren Promotors in Wildtypzellen überproduziert wurden. Die Anreicherung der Bactofilin-Homologe führte in beiden Fällen zu drastischen morphologischen Veränderungen: Erst schwellen die Zellen sichtbar an und bogen sich (circa 4 h nach Zugabe der Xylose), dann rollten sie sich stark auf (nach circa 6 h) und lysierten später (Daten nicht gezeigt).

Um die Rolle der Bactofiline bei den beobachteten morphologischen Veränderungen genauer untersuchen zu können, wurden diese Versuche mit Fluoreszenz-markierten Derivaten der Proteine wiederholt. Die Form der Zellen wurde durch die Anreicherung der Fluoreszenzfusionen in gleichem Maße beeinflusst, wie bei Überproduktion der nativen Proteine (Abbildung 3.5A). Unter den getesteten Bedingungen bildeten beide Fusionsproteine filamentöse Strukturen entlang der inneren Biegung der Zelle, was an die Lokalisation des Intermediärfilament-ähnlichen





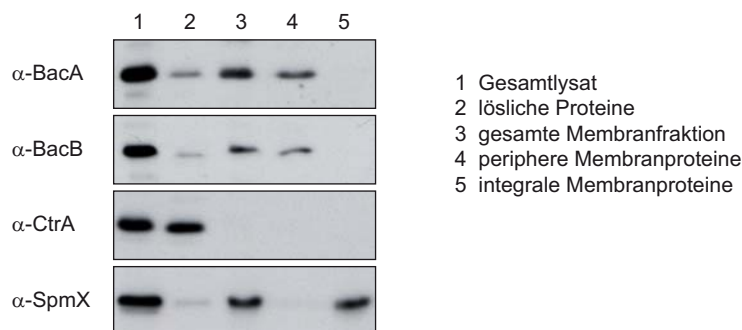
**Abbildung 3.5:** Veränderungen der Zellmorphologie und Filamentbildung nach Überproduktion von BacAB. **A)** Änderungen der Zellform nach Produktion von BacAB im Wildtyp. Zellen des Wildtypstammes CB15N, die ein Plasmid zur Überexpression von *bacA-venus* (pJK13) oder *bacB-venus* (pJK14) tragen, wurden in PYE-Medium angezogen. Um die Synthese der Fusionsproteine zu induzieren wurde Xylose in einer Endkonzentration von 0,3 % zugesetzt (t=0). Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeiten DIC- und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. **B)** Krümmung der Zellen nach Überproduktion von BacAB in der Abwesenheit von Crescentin. Ein *creS*-Deletionsstamm (*creS::Tn5*) wurde mit den Plasmiden pJK16 (*P<sub>xyI</sub>-bacA-venus*) oder pJK17 (*P<sub>xyI</sub>-bacB-venus*) transformiert. Die Zellen wurden in PYE-Medium angezogen, die Synthese der Fusionsproteine mit 0,3 % Xylose induziert und zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen mittels DIC- und Fluoreszenzmikroskopie beobachtet. Balken: 2 µm.

Proteins Crescentin (CreS) erinnert [8]. Crescentin ist für die typische, leicht gebogene Form von Wildtyp-*C. crescentus*-Zellen verantwortlich, und eine Mutante, die kein funktionelles CreS bilden kann, nimmt eine gerade Stäbchenform an. Um zu überprüfen, ob CreS möglicherweise als eine Art Gerüst für die Anlagerung von Bactofilinen in *C. crescentus* fungiert, wurden BacA und BacB in einem Deletionsstamm (CB15N *creS::Tn5*) überproduziert. Die resultierenden Stämme zeigten nach Induktion der Überexpression den gleichen Phänotyp wie Zellen mit funktionellem CreS (Vergleich der Abbildungen 3.5A und B), was eine Abhängigkeit der BacAB-Lokalisation von CreS ausschließt und eine intrinsische Fähigkeit der Bactofiline zur Bildung polymerer Komplexe in der inneren Biegung der Zellen nahelegt.

Mittels quantitativer Western Blot-Analyse konnte die Menge an BacA und BacB in Zellen bestimmt werden, nachdem die Produktion der Proteine für 4 h induziert worden war. Die BacA-Menge war nach Überproduktion im Vergleich zum Wildtyp um das 130-fache, die BacB-Menge um das 360-fache erhöht, wobei in Wildtyp-Zellen ohne entsprechende Überexpressionsplasmide ungefähr zehnmal mehr BacA als BacB-Moleküle nachweisbar waren (Daten nicht gezeigt).

Da die Sequenzanalyse von BacA und BacB für beide Proteine eine zytoplasmatische Lokalisation voraussagte, die Lokalisation der Fusionsproteine (vor allem bei Überproduktion) aber auf eine Assoziation mit der Membran hindeutete, wurde eine Zellfraktionierung von Wildtyp-*C. crescentus*-Zellen durchgeführt. Hier konnte gezeigt werden, dass BacA und der Großteil von BacB mit den Membranen co-sedimentieren und sich von der Fraktion löslicher Proteine trennen lassen (Abbildung 3.6). Die Interaktion der Bactofiline mit der Zellmembran konnte unter alkalischen Bedingungen (Inkubation in 1 M Natriumcarbonat) gelöst werden, was auf

eine periphere Assoziation hindeutet, da integrale Membranproteine durch diese Behandlung nicht aus der Membran entfernt werden können [124].

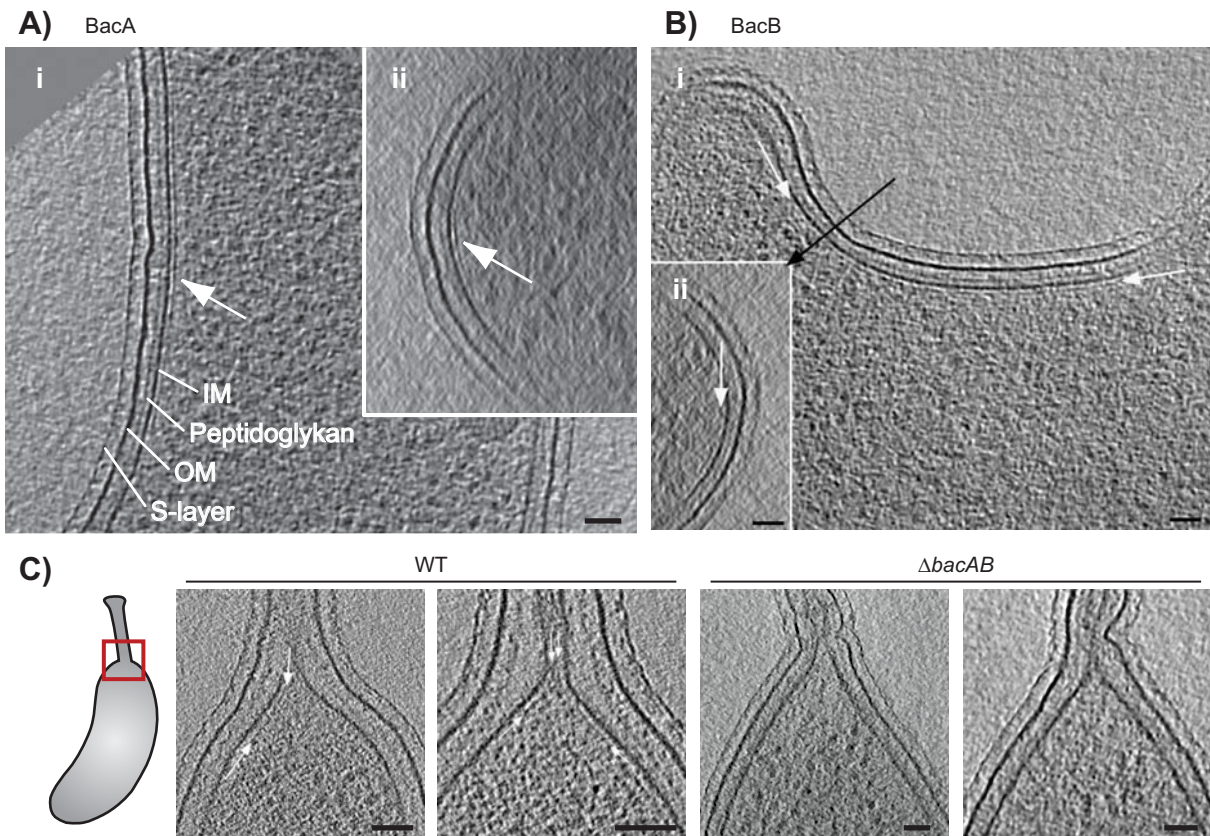


**Abbildung 3.6:** Membranassoziation von BacA und BacB. Zellysate des Wildtypstammes CB15N wurde mittels Ultrazentrifugation in eine lösliche und eine Membranfraktion separiert. Ein Teil der Membranen wurde zusätzlich mit 1 M Natriumcarbonat behandelt, um assoziierte Proteine von integralen Membranproteinen abtrennen zu können. Proben der verschiedenen Fraktionen wurden mittels Western Blot unter Verwendung von Antikörpern gegen BacA, BacB, CtrA und SpmX analysiert. Der Zellzyklusregulator CtrA dient als Kontrolle für ein lösliches Protein [47], wohingegen SpmX in der inneren Membran verankert ist und somit als Kontrolle für integrale Membranproteine fungiert [140].

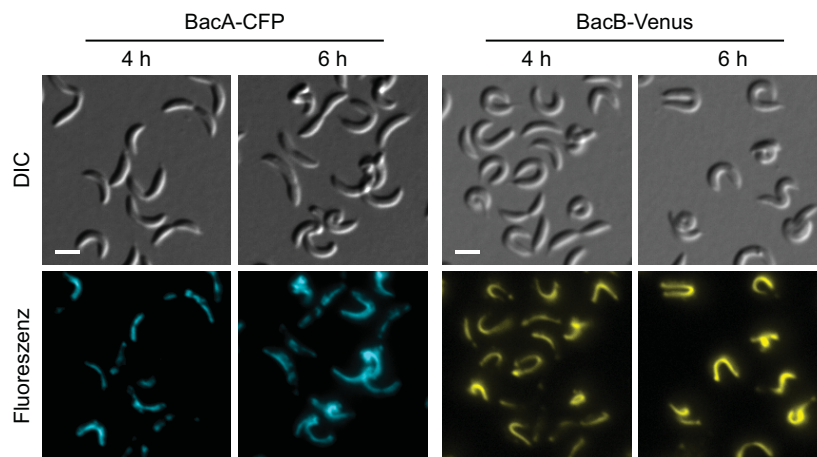
Um zu testen, ob sich BacA und BacB zu Membran-assoziierten Polymeren zusammenlagern, wurde die Ultrastruktur eines Stammes, der das Protein BacA überproduziert, mittels Kryoelektronentomographie aufgelöst. In allen untersuchten Zellen konnte eine ausgedehnte Blatt-ähnliche Struktur nachgewiesen werden, die sich in einer Entfernung von circa 9 nm an die innere Membran anschmiegt (Abbildung 3.7A). Diese Struktur ist nur in der inneren Biegung von nach Überproduktion deformierten Zellen nachweisbar und korreliert mit dem im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesenen Signal des Fusionsproteins. Gleiche Ergebnisse lieferte die Untersuchung eines Stammes, der BacB überproduziert (Abbildung 3.7B), so dass sich zusammenfassend sagen lässt, dass beide Bactofilin-Homologe aus *C. crescentus* nach Überproduktion *in vivo* in der Lage sind, Membran-assoziierte polymere Strukturen zu bilden, die sich in der inneren Biegung der Zellen anlagern.

Die Untersuchung der von BacAB unter natürlichen Bedingungen gebildeten Cluster am Pol gestaltete sich als schwierig, da die Membran an der Basis des Stiels stark gebogen ist und somit die Sensitivität und die Auflösung im Kryotomogramm sinkt. Doch auch hier konnten kleinere Strukturen nachgewiesen werden, die den ausgedehnten ‚Blättern‘ der Überproduktionsstämme ähneln und die gleiche Entfernung zur Membran aufweisen (Abbildung 3.7C). Diese im Tomogramm als dunkle Striche erscheinenden Strukturen konnten in einem  $\Delta bacAB$ -Stamm nicht detektiert werden, was die Hypothese bestätigt, dass BacA und BacB an der Membran des bestielten Pols polymere Ansammlungen ausbilden können.

Beide Bactofiline sind in der Lage, nach Überproduktion im  $\Delta bacAB$ -Stamm (JK5) unabhängig voneinander identische polymere Strukturen auszubilden (Abbildung 3.8). Die Überproduktion von fluoreszenzmarkierten Derivaten der Proteine führte zu den auch im Wildtyp auftretenden Morphologieänderungen, sowie einer Anlagerung der Fusionsproteine in der inneren Biegung der Zellen (Vergleich mit Abbildung 3.5A).



**Abbildung 3.7:** Kryo-electronentomogramme verschiedener Stämme. **A)** Ultrastruktur eines Stammes, der BacA überproduziert. Zellen des Wildtypstammes CB15N, die ein Plasmid zur Überexpression von *bacA* (pJK4) tragen, wurden in PYE-Medium angezogen, für 4 h mit 0,3 % Xylose induziert und mittels Kryo-electronentomographie untersucht. Gezeigt sind ein Längsschnitt (13 nm Schnitt, i) und ein Querschnitt (38 nm Schnitt, ii) auf Höhe der Zellmitte. IM - innere Membran, OM - äußere Membran. **B)** Ultrastruktur eines Stammes, der BacB überproduziert. Zellen des Wildtypstammes CB15N wurden mit dem Plasmid pJK6 ( $P_{xyl}$ -*bacB*) transformiert, in PYE-Medium angezogen, für 4 h mit 0,3 % Xylose induziert und mittels Kryo-electronentomographie untersucht. Gezeigt sind ein Längsschnitt (15 nm Schnitt, i) und ein Querschnitt (29 nm Schnitt, ii). **C)** Ultrastruktur des bestielten Pols von Wildtyp und  $\Delta bacAB$ -Zellen. Die Zellen wurden in PYE-Medium angezogen und mittels Kryo-electronentomographie analysiert. Nur in den Schnitten aus Wildtypzellen sind Blatt-ähnliche Strukturen in der Nähe der Stielbasis nachweisbar (Pfeile, 5 nm Schnitte für Wildtyp und 11 nm Schnitte für  $\Delta bacAB$ ). Balken: 50 nm (Bilder in Kooperation mit Ariane Briegel und Grant Jensen)



**Abbildung 3.8:** Zusammenlagerung von BacA oder BacB zu polymeren Strukturen in der Abwesenheit des entsprechenden Paralogs. Zellen des Doppeldeletionsstamms JK5 ( $\Delta bacAB$ ) wurden entweder mit dem Plasmid pJK53 ( $P_{xyl}$ -*bacA-ecfp*) oder mit pJK14 ( $P_{xyl}$ -*bacB-venus*) transformiert, in PYE-Medium angezogen und mit 0,3 % Xylose induziert ( $t=0$ ). Nach den angegebenen Zeitspannen wurden die Zellen mittels DIC- und Fluoreszenzmikroskopie beobachtet. Balken: 2  $\mu\text{m}$ .



### 3.1.3 BacA und BacB polymerisieren *in vitro* ohne Zusatz von Co-Faktoren

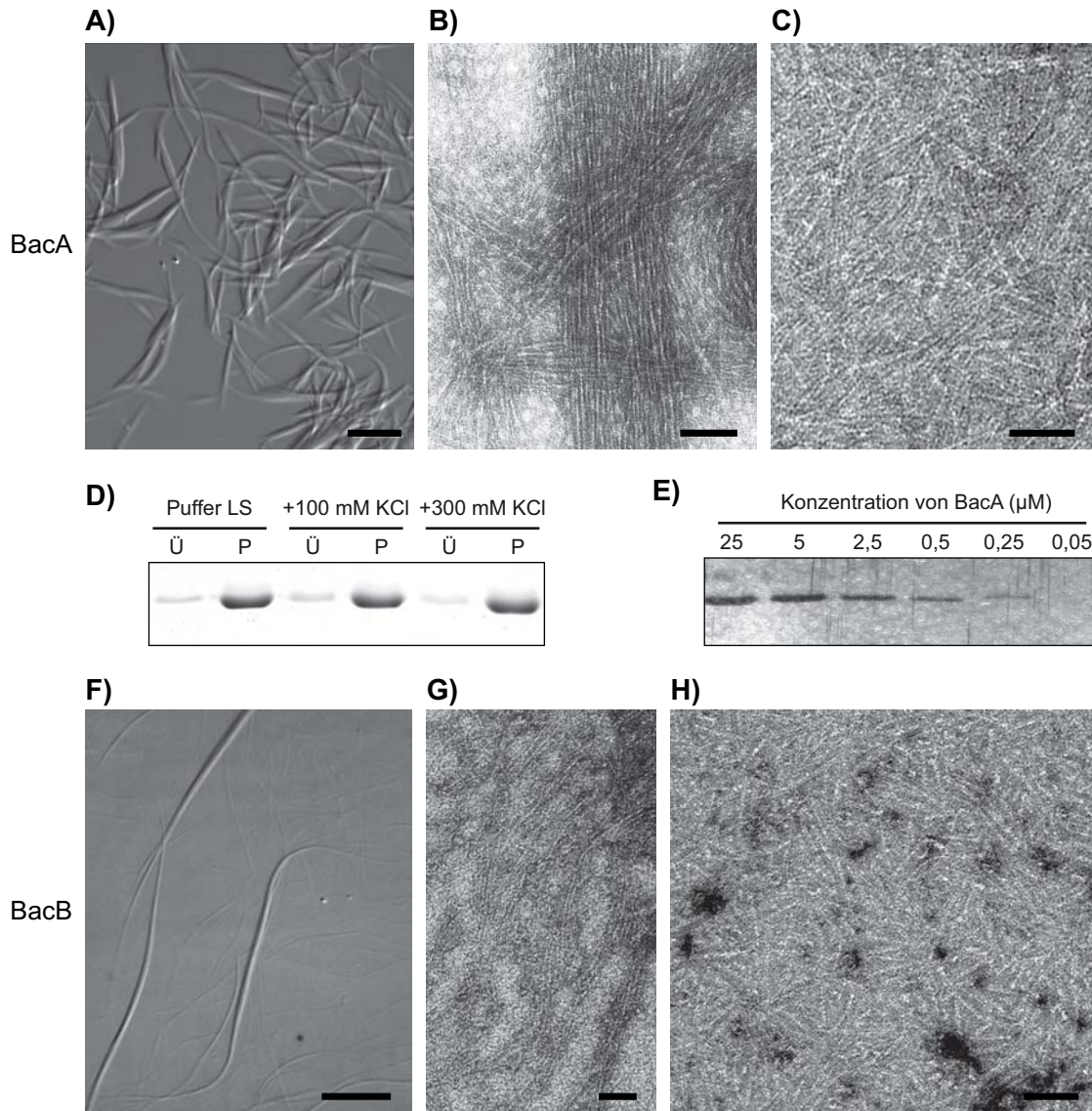
Übereinstimmend mit den ultrastrukturellen Analysen konnten sich die Proteine BacA und BacB nach Überproduktion in *E. coli* und Aufreinigung mittels chromatographischer Methoden spontan zu Filamenten zusammenlagern. Dieses Verhalten hatte zur Folge, dass Proteinlösungen mit hohen Konzentrationen an BacAB teilweise sehr viskos waren, was die Aufreinigung erschwerte (siehe Abschnitt 2.4.8).

In einem Puffer mit geringer Salzkonzentration (Puffer LS für *low salt*) bildete aufgereinigtes BacA große Kabel, die im Lichtmikroskop bei 1000-facher Vergrößerung beobachtet werden konnten (Abbildung 3.9A). Mit Hilfe der Transmissions-Elektronenmikroskopie konnten diese Strukturen näher untersucht werden und es zeigte sich, dass die beschriebenen Kabel aus einzelnen, lose gebündelten Protofilamenten von circa 3 nm Durchmesser bestehen (Abbildung 3.9B). In einem Puffer mit physiologischen Salzkonzentrationen (verwendet wurde Puffer LS mit Zusatz von 100 oder 300 mM KCl) waren ebenso Filamente nachweisbar, wobei die Bündelung, das heißt die lateralen Interaktionen zwischen den einzelnen Protofilamenten, schwächer ausfielen und sich meist nur zwei bis drei Protofilamente aneinander gelagert hatten (siehe Abbildung 3.9C).

Die Ausbildung von Polymeren in den verschiedenen Puffern (Puffer LS ohne Zusatz oder mit Zusatz von 100 oder 300 mM KCl) wurde durch Sedimentationsexperimente bestätigt. Unabhängig von den verwendeten Puffern konnte nach der Zentrifugation der Proteinlösungen der Großteil von BacA im Sediment und nicht im Überstand der Proben nachgewiesen werden (Abbildung 3.9D).

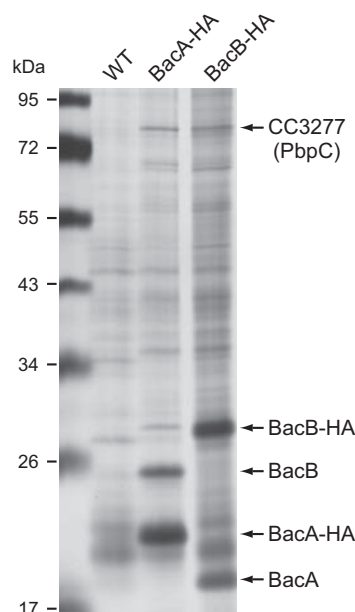
Um die für die Polymerisation von BacA nötige, kritische Konzentration zu bestimmen, wurde gereinigtes Protein in Puffer verdünnt und mehrere Tage equilibriert. Diese Inkubationszeit wurde gewählt, damit auch während der Proteinaufreinigung ankonzentrierte Polymere zerfallen konnten und sich ein für die jeweilige Proteinkonzentration typisches Gleichgewicht aus gelösten und polymeren BacA-Molekülen einstellen konnte. Daraufhin konnte durch Sedimentation eine Polymerisation von BacA bis zu einer Proteinkonzentration von 250 nM nachgewiesen werden (Abbildung 3.9E), was für eine sehr effektive Interaktion zwischen einzelnen Bactofilin-Monomeren spricht. Auch hier war es irrelevant, ob das Protein in Niedrigsalzpuffer vorlag oder der Probe 300 mM KCl zugesetzt wurden.

BacB ließ sich im Gegensatz zu seinem Paralog nicht in ausreichenden Mengen für biochemische Studien aufreinigen, sondern nur aus dem Lysat eines entsprechenden *E. coli*-Stammes, der BacB produzierte, anreichern. Die Analyse der gebildeten Strukturen mittels Licht- und Elektronenmikroskopie ergab aber ein mit BacA vergleichbares Polymerisationsverhalten. So konnten schon mit Hilfe eines Lichtmikroskops große, filamentöse Strukturen, ähnlich der von BacA gebildeten Polymere, detektiert werden (Abbildung 3.9F). Wie die Abbildung 3.9G zeigt, sind unter Niedersalzbedingungen stark vernetzte, polymere Strukturen nachweisbar, wobei durch Dialyse des Proteins gegen Puffer mit höheren Salzkonzentrationen diese Netzwerke zerfallen und sich Strukturen aus überwiegend ein bis zwei Protofilamenten ausbilden (Abbildung 3.9H).



**Abbildung 3.9:** Polymerisation von BacA und BacB *in vitro*. **A)** BacA-Polymere im Lichtmikroskop. DIC-Aufnahme der Proteine nach Dialyse gegen Puffer LS (10 mM HEPES/NaOH, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EDTA, 1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, pH 7,2). Balken: 10  $\mu$ m. **B)** Elektronenmikroskopische Aufnahme von BacA-Protofilamentbündel in Puffer LS. Balken: 75 nm. **C)** Polymerisation von BacA in Puffer LS mit Zusatz von 300 mM KCl. Die einzelnen Protofilament lagern sich zu dünnen Bündeln, meist nur aus zwei bis drei Einzelstrukturen zusammen. Balken: 50 nm. **D)** Polymerisationseffizienz von BacA in verschiedenen Puffern. BacA wurde gegen Puffer LS ohne, mit 100 mM KCl oder mit 300 mM KCl dialysiert. Nach Ultrazentrifugation wurden Proben vom Überstand und vom Sediment auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Proteine wurden mit Hilfe einer Coomassie-Färbung visualisiert. **E)** Stabilität der BacA-Polymere. BacA wurde gegen Puffer LS dialysiert und zu den angegebenen Konzentrationen verdünnt. Nach Equilibrierung für 60 h bei 4 °C wurden die Polymere mittels Ultrazentrifugation sedimentiert und in einem äquivalenten Volumen SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Proben wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen, und BacA wurde mittels Silberfärbung detektiert. Gleiche Daten lieferte die Wiederholung dieses Experiments mit Proben, die gegen Puffer LS mit Zusatz von 300 mM KCl dialysiert worden waren (nicht gezeigt). **F)** BacB-Polymere im Lichtmikroskop. DIC-Aufnahme des Zelllysates eines *E. coli*-Stamms, der BacB überproduzierte, nach Aufschluss mittels zwei French Press-Passagen und Sedimentation grober Partikel. Balken: 10  $\mu$ m. **G)** BacB-Polymere im Elektronenmikroskop. Polymerisationsverhalten nach Dialyse gegen Puffer LS. Balken: 50 nm. **H)** BacB-Polymere in Puffer A5 (50 mM NaPO<sub>4</sub>, 5 mM Mg<sub>2</sub>Cl, 0,1 mM EDTA, 1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, pH 7) mit 300 mM NaCl. Die einzelnen Strukturen bestehen meist aus zwei lateral aneinandergelagerten Protofilamenten. Balken: 50 nm. Für die Negativkontrastierung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden die Proteine mit 2 % Uranylacetat behandelt (in Kooperation mit Erhard Mörschel).

**Abbildung 3.10:** Identifikation von Interaktionspartnern mittels Co-Immunpräzipitation. Lysate von den mit Formaldehyd behandelten Stämmen CB15N (Wildtyp), KL7 (*bacA*-HA) und KL8 (*bacB*-HA) wurden mit einer anti-HA-Affinitätsmatrix inkubiert und die präzipitierten Proteine auf ein SDS-Gel geladen. Die Proteine wurden mittels Silberfärbung detektiert, und spezifische Banden der Proben zu Stamm KL7 und KL8 wurden mittels MALDI-MS-Analyse in Kooperation mit Jörg Kahnt untersucht.

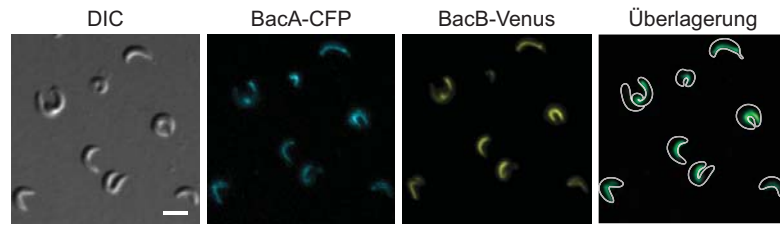


### 3.1.4 Bactofilin interagieren miteinander und vermitteln die Lokalisation einer Peptidoglykansynthase

Aufgrund der zeitlich regulierten Lokalisation zur Stielbasis lag die Vermutung nahe, dass BacAB für die Rekrutierung weiterer Faktoren zum Pol von Bedeutung sein könnten. Um mögliche Interaktionspartner von BacA und BacB in *C. crescentus* identifizieren zu können, wurden Stämme konstruiert, die entweder BacA-HA (KL7) oder BacB-HA (KL8) anstelle des Wildtypproteins produzieren. Bei einer Co-Immunpräzipitation von Lysaten dieser Stämme mit Hilfe einer anti-HA-Affinitätsmatrix konnte BacB mit BacA-HA präzipitiert werden und BacA mit BacB-HA, was eine Interaktion der beiden Proteine nahe legt (Abbildung 3.10). Diese Interaktion zwischen BacA und BacB deutete sich schon durch die gemeinsame Lokalisation am Zellpol und die identischen Eigenschaften der aufgereinigten Proteine an.

Verifiziert werden konnten die Ergebnisse der Co-Immunpräzipitation *in vivo* durch weitere Lokalisationsstudien: Es konnte gezeigt werden, dass eine chromosomal codierte BacA-CFP-Fusion nach Überproduktion von BacB-Venus ihre typische polare Lokalisation verliert und die gleiche Verteilung in der inneren Biegung der Zelle annimmt, wie das dort akkumulierte BacB (Abbildung 3.11). Dies deutet darauf hin, dass die beobachteten Strukturen am Pol, wie auch in der Biegung der Zellen, jeweils Co-Polymere aus BacA- und BacB-Untereinheiten darstellen.

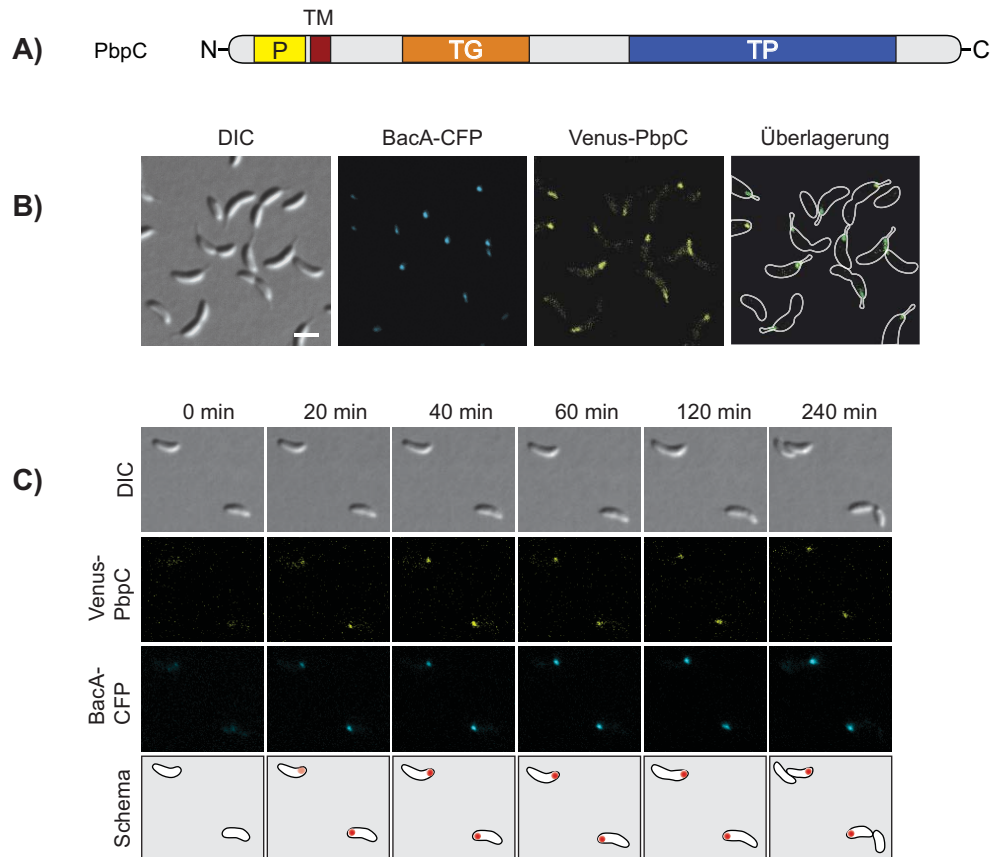
Mit Hilfe der Massenspektrometrie wurde in den durch die Co-Immunpräzipitation gewonnenen Proben nach weiteren Interaktionspartnern von BacA und BacB gesucht. So konnte CC3277, eines der fünf im *C. crescentus*-Genom codierten bifunktionellen Penicillin-bindenden Proteine (PBPs), als Interaktionspartner für beide Bactofiline identifiziert werden (Abbildung 3.10). CC3277 - im weiteren Verlauf als PbpC (*Penicillin-binding protein C*) bezeichnet - ist ein 80,2 kDa großes Protein, bestehend aus einem Prolin-reichen zytoplasmatischen Teil, einer



**Abbildung 3.11:** Detektion der Interaktion zwischen BacA und BacB *in vivo*. Zellen des Stamms MT260 (*bacA-ecfp*) wurden mit dem Plasmid pJK17 ( $P_{xyl}$ -*bacB-venus*) transformiert, in PYE-Medium angezogen und für 6 h mit 0,3 % Xylose induziert. Daraufhin wurden die Zellen mittels DIC- und Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Balken: 2  $\mu$ m.

Transmembranhelix und dem für bifunktionelle PBP's typischen großen periplasmatischen Anteil, der eine Transpeptidase- und eine Transglykosylasedomäne aufweist (Abbildung 3.12A).

Mittels Western Blot Analyse von Proben synchronisierter Wildtyp-Zellen konnte das Pro-



**Abbildung 3.12:** Lokalisation von PbpC. **A)** Schematische Darstellung von PbpC. Die Prolin-reiche Region wurde in Gelb abgebildet, die Transmembrandomäne (TM, AS 86-108) in Rot, die Transglykosylasedomäne (TG, AS 133-300) in Orange und die Transpeptidasedomäne (TP, AS 401-668) in Blau. **B)** Co-Lokalisation von BacA und PbpC. Zellen des Stamms JK271 (*bacA-ecfp xylX::P<sub>xyl</sub>-venus-pbpC*) wurden in PYE-Medium angezogen, für 1 h mit 0,03 % Xylose inkubiert und mittels DIC- und Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Balken: 2  $\mu$ m. **C)** Zellzyklus-abhängige Lokalisation von PbpC. Stamm JK271 wurde in M2G-Medium angezogen und für 1 h mit 0,03 % Xylose induziert. Nach der Synchronisation wurden die Schwärmerzellen auf einen mit Agarose und 0,03 % Xylose in M2G-Medium beschichteten Objektträger transferiert und die Entwicklung der Zellen mittels DIC- und Fluoreszenzmikroskopie verfolgt. Das Schema verdeutlicht das erhaltene Lokalisationsmuster von BacA und PbpC.

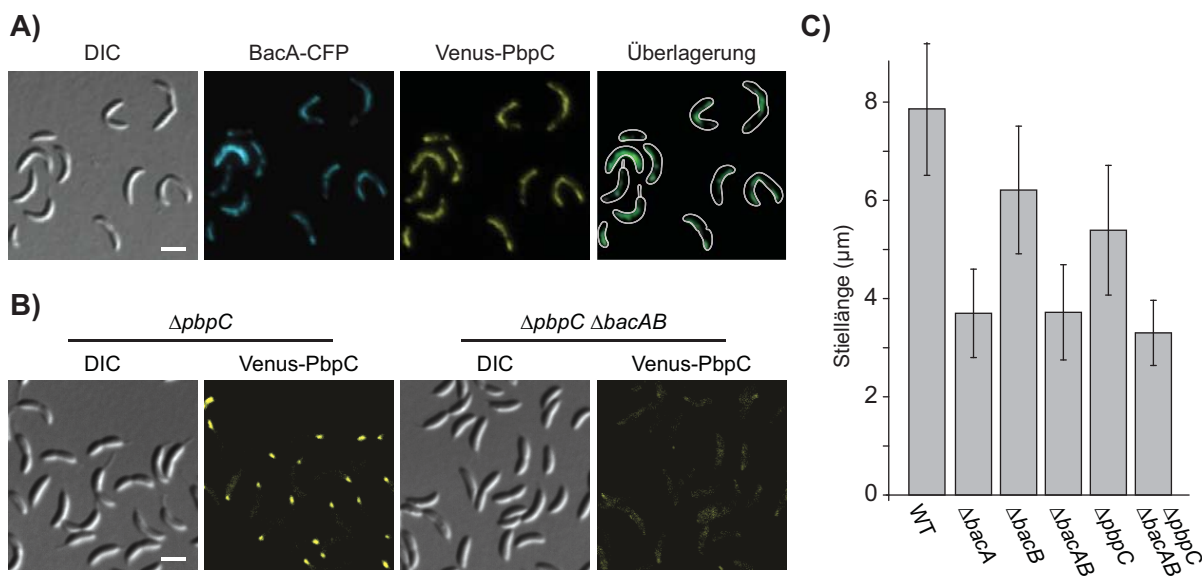


tein - ebenso wie BacA und BacB - während des gesamten Verlaufs des Zellzyklus in gleich bleibenden Mengen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Für eine Interaktion von PbpC mit den zwei Bactofilin-Homologen spricht auch die Lokalisation des Proteins. Ein Venus-PbpC-Fusionsprotein lokalisierte am bestialen Pol, wo es mit BacA-CFP (und als Konsequenz auch mit BacB) co-lokalisiert (Abbildung 3.12B). In Zeitrafferaufnahmen konnte außerdem gezeigt werden, dass PbpC in Schwärmerzellen diffus verteilt vorliegt und wie BacAB während des Schwärmer-zu-Stielzellen-Übergangs zum Pol rekrutiert wird (Abbildung 3.12C).

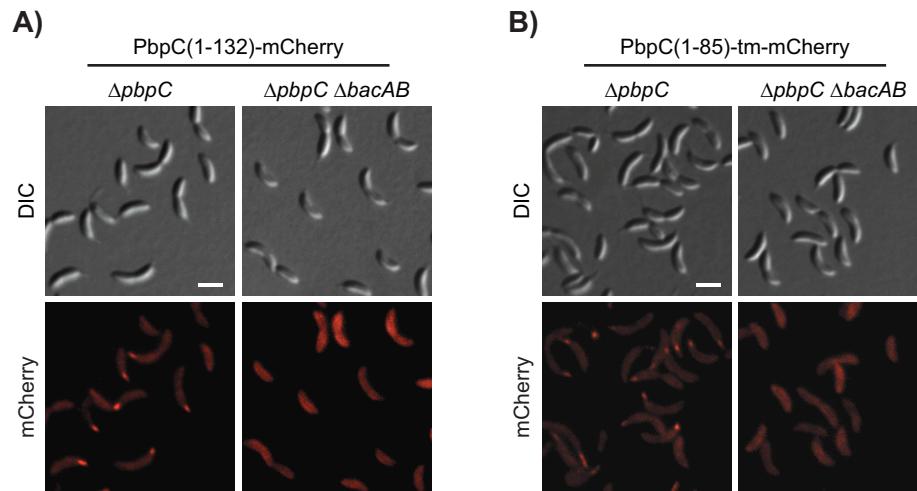
Die Überproduktion von BacA-CFP führte, wie erwartet, zu einer Umverteilung von Venus-PbpC in der Zelle. Die Peptidoglykansynthese übernahm die Lokalisation von BacA und war in der inneren Biegung der Zelle nachweisbar (Abbildung 3.13A). Da PbpC unter allen getesteten Bedingungen mit BacA und BacB co-lokalisierte lag die Vermutung nahe, dass die Bactofilin-Cluster in der Zelle als eine Art Plattform für die Rekrutierung dieses Proteins benötigt werden. Tatsächlich war in einem Deletionsstamm ( $\Delta bacAB \Delta pbpC$   $P_{xyl}$ -venus-pbpC, JK310) nur noch ein gleichmäßig in der Membran verteiltes Fluoreszenzsignal, aber keine polaren PbpC-Ansammlungen nachweisbar (Abbildung 3.13B).

Da BacA und BacB löslich und nur mit der Membran assoziiert sind, sollten der kurze zytoplasmatische Teil und möglicherweise die Transmembrandomäne von PbpC die nötigen



**Abbildung 3.13:** Interaktion von PbpC mit BacAB *in vivo*. **A)** Rekrutierung von PbpC zur inneren Biegung der Zellen durch Überproduktion von BacA. Zellen des Stammes MT279 ( $xylX::P_{xyl}$ -venus-pbpC) wurden mit dem Plasmid pJK53 ( $P_{xyl}$ -bacA-ecfp) transformiert, in PYE-Medium angezogen, 4 h mit 0,3 % Xylose inkubiert und DIC- und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Balken: 2  $\mu m$ . Anmerkung: Wird Stamm MT279 ohne das Überexpressionsplasmid unter diesen Bedingungen angezogen sind nur polare Signale nachweisbar (Daten nicht gezeigt). **B)** Verlust der polaren Lokalisation von PbpC durch Deletion von *bacAB*. Stamm JK308 ( $\Delta pbpC$   $xylX::P_{xyl}$ -venus-pbpC) und JK310 ( $\Delta bacAB \Delta pbpC$   $xylX::P_{xyl}$ -venus-pbpC) wurden in PYE-Medium angezogen, für 1 h mit 0,03 % Xylose induziert und mittels DIC- und Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Balken: 2  $\mu m$ . **C)** Reduktion der Stiellänge in Zellen ohne Bactofilin-Homolog und/oder PbpC. Die Stämme CB15N (Wildtyp), MT257 ( $\Delta bacA$ ), MT259 ( $\Delta bacB$ ), JK5 ( $\Delta bacAB$ ), MT304 ( $\Delta pbpC$ ) und JK281 ( $\Delta bacAB \Delta pbpC$ ) wurden in PYE-Medium angezogen, 1:20 in Minimalmedium ohne Phosphat ( $M2G^{-P}$ ) überführt und für weitere 24 h kultiviert. Die Zellen wurden mittels DIC-Mikroskopie untersucht und die mittlere Stiellänge von 100-200 Zellen wurde mit der Hilfe des Programms MetaMorph bestimmt.

Motive für eine Interaktion mit den Bactofilin-Clustern beinhalten. In der Tat zeigte ein Fusionsprotein, bei dem der periplasmatische Teil PbpCs durch das rot fluoreszierende Protein mCherry ersetzt wurde (PbpC(1-132)-mCherry), die gleiche BacAB-abhängige Lokalisation wie das Wildtypprotein (Abbildung 3.14A). Ferner ist der zytoplasmatische Anteil allein ausreichend für dieses Lokalisationsverhalten, da ein Fusionsprotein aus dem N-Terminus von PbpC, der Transmembranhelix des Proteins MreC, einer kurzen verknüpfenden Sequenz und mCherry (PbpC(1-85)-tm-mCherry) die gleichen Ergebnisse lieferte (Abbildung 3.14B). Die Transmembrandomäne von MreC wurde hier gewählt, da dieses Protein nach bisherigen Experimenten in keinem Zusammenhang mit den Bactofilinen oder PbpC steht und schon zuvor gezeigt werden konnte, dass die Helix allein keine spezifische Lokalisation verursacht [122].

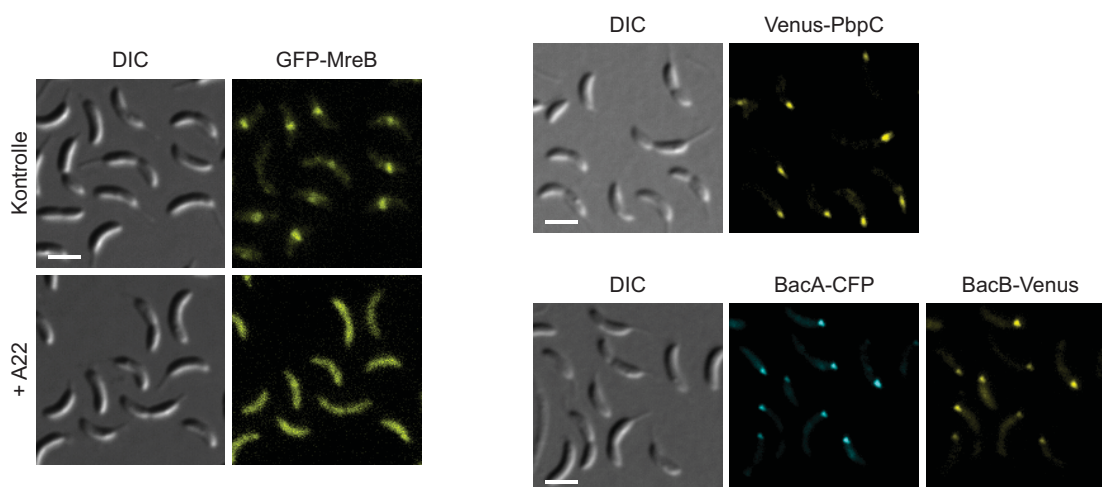


**Abbildung 3.14:** Bestimmung der Proteinregion aus PbpC, die für die Interaktion mit BacAB benötigt wird. **A)** Die Stämme JK279 ( $\Delta pbpC$   $xylX::P_{xyl}-pbpC(1-132)-mCherry$ ) und JK289 ( $\Delta bacAB$   $\Delta pbpC$   $xylX::P_{xyl}-pbpC(1-132)-mCherry$ ) wurden in PYE-Medium kultiviert, für 2 h mit 0,03 % Xylose induziert und mittels DIC- und Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. **B)** JK291 ( $\Delta pbpC$   $xylX::P_{xyl}-pbpC(1-85)-tm-mCherry$ ) und JK287 ( $\Delta bacAB$   $\Delta pbpC$   $xylX::P_{xyl}-pbpC(1-85)-tm-mCherry$ ) besitzen ein Xylose-induzierbares Gen, welches für einen Hybrid aus zytoplasmatischem Anteil von PbpC (AS 1-85), der Transmembranhelix von MreC, einer kurzen unstrukturierten Verbindungssequenz aus FtsN und dem Fluoreszenzprotein mCherry codiert. Beide Stämme wurden in PYE-Medium angezogen, für 2 h mit 0,03 % Xylose inkubiert und mittels DIC- und Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Balken: 2  $\mu$ m.

Diese Ergebnisse bezeugen, dass Bactofilin-Cluster als polare Lokalisationsfaktoren für die Peptidoglykansynthese PbpC dienen. Mit Hilfe von BacAB wird PbpC zu einem Zeitpunkt rekrutiert, an dem die Zelle von einem planktonischen Lebensstil in eine sessile Phase übergeht und an eben diesem Pol die Prostheka ausgebildet wird, was auf eine Rolle in der Stiellbiogenese schließen lässt. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde der Effekt einer Deletion von *bacA*, *bacB* oder *pbpC* auf die Stielausbildung getestet. Dazu wurden die verschiedenen Stämme in einem phosphatfreien Medium (M2G<sup>-P</sup>-Medium) kultiviert, da unter diesen Bedingungen die Prostheka von *C. crescentus* Zellen stark verlängert wird [68] und so ein eventueller Defekt besser zu beobachten ist. Keiner der hier vorgestellten Stämme wies sichtbare Veränderungen der generellen Zellmorphologie auf, wohingegen die Stiellänge in einem  $\Delta bacA$ -Stamm (MT257) auf circa 45 % im Vergleich zum Wildtyp verkürzt war (Abbildung 3.13C). Dies unterstützt die These, dass Bactofilin-Cluster an der Stiellmorphogenese beteiligt sind. Analysen mittels Kryoelektronentomographie konnten keine Unterschiede in der Ultrastruktur der

Prosthekae in einem  $\Delta bacAB$ -Stamm im Vergleich zum Wildtyp aufdecken (Daten nicht gezeigt), was dafür spricht, dass die Deletion vor allem das longitudinale Wachstum beeinflusst. Ergebnisse ähnlich denen der *bacA*-Deletion zeigten die  $\Delta bacAB$  Doppelmutante (JK5) und die  $\Delta bacAB \Delta pbpC$  Dreifachmutante (JK281). Da die Effekte einer *bacB*- oder einer *pbpC*-Deletion allein schwächer ausfielen, scheint BacA funktionell dominanter als BacB zu sein und möglicherweise neben der Lokalisierung von PbpC zum Pol noch andere Funktionen in der Zelle auszuüben.

Da das MreB-Zytoskelett für die Polmorphogenese in *C. crescentus* von Bedeutung ist, wurde eine mögliche Beziehung zu BacAB oder PbpC untersucht. Das Zerstören der MreB-Helix mit Hilfe der Chemikalie A22 [87, 64] hatte keinen Effekt auf die Lokalisation von BacAB und PbpC (Abbildung 3.15), was darauf schließen lässt, dass Bactofiline nicht nur, wie in Abschnitt 3.1.2 gezeigt, unabhängig von CreS, sondern auch unabhängig vom Aktin-ähnlichen Zytoskelett agieren.



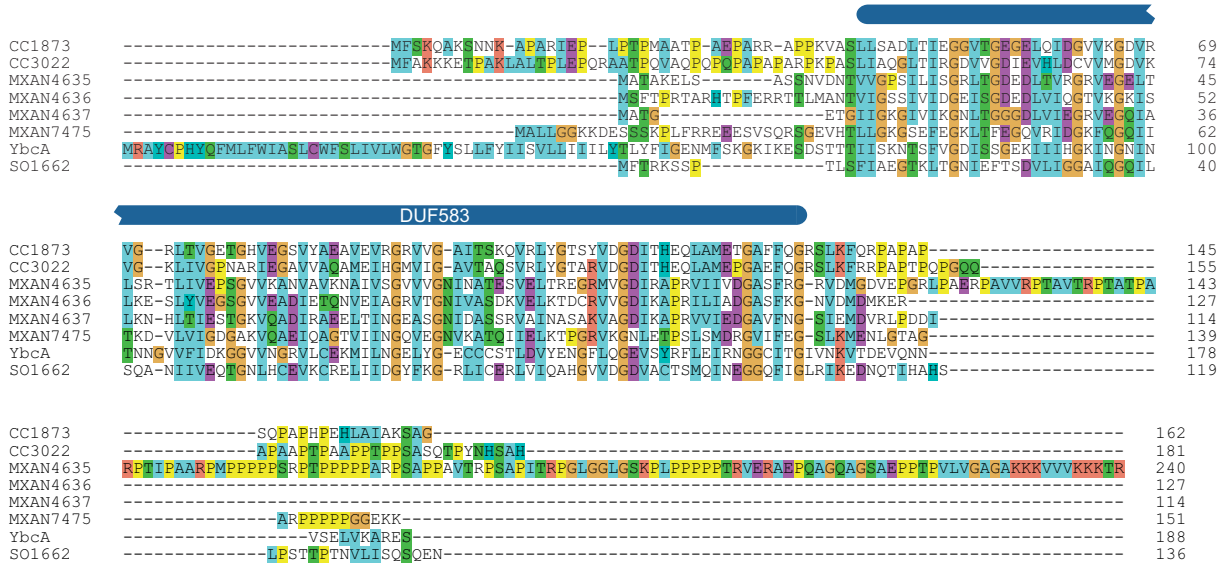
**Abbildung 3.15:** Einfluss des MreB-Zytoskeletts auf die Lokalisation von BacAB und PbpC. Die Stämme MT279 (*xytX::P<sub>xyt</sub>-venus-pbpC*), JK34 (*bacA-ecfp bacB-venus*) und als Kontrolle JK90 (*xytX::P<sub>xyt</sub>-eyfp-mreB*) wurden für 1 h (MT279) oder 2 h (JK90) mit 0,03 % Xylose induziert. Daraufhin wurden die Kulturen 5 min mit 10 µg/ml A22 behandelt und mittels DIC- und Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Balken: 2 µm.

### 3.1.5 Bactofilin-Homologe sind weit verbreitet unter Bakterien

Bei einer Suche in der Pfam-Datenbank [58] nach Proteinen, die die für Bactofiline charakteristische Domäne DUF583 enthalten, findet man heute über 800 Sequenzen von 555 verschiedenen bakteriellen Spezies aus allen Phyla, für die komplette Genome sequenziert sind. Fast alle diese Proteine besitzen die gleiche Architektur wie BacA und BacB, das heißt, sie bestehen aus einer einzelnen Domäne DUF583, die von kurzen, meist ungeordneten und geladenen, terminalen Sequenzen flankiert wird. Für den Großteil der annotierten Bactofilin-Homologe wird ebenfalls wie für BacA und BacB ein lösliches Verhalten vorhergesagt. Eine Ausnahme bilden hier fast alle durch Enterobakterien produzierten Bactofiline, da diese N-terminal ein bis zwei Transmembrandomänen aufweisen, wobei die Domäne DUF583 vermutlich in

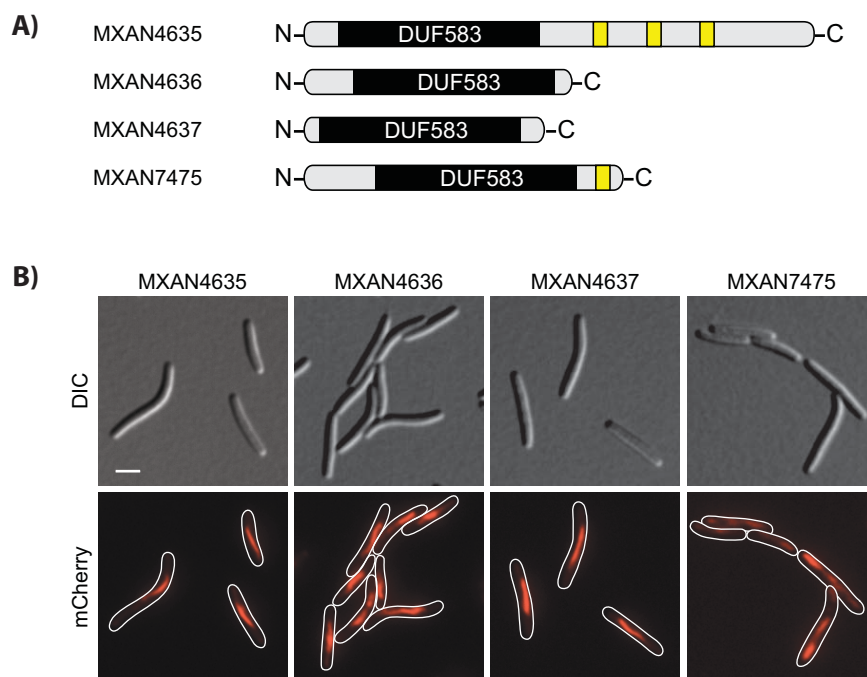
Richtung Zytoplasma orientiert ist. Interessanterweise besitzen viele Spezies zwei oder mehr Bactofilin-Paraloge, die entweder in Operons organisiert oder über das Genom verteilt sind. Die Allgegenwärtigkeit der Bactofiline sowie die hohe Frequenz an Genduplikationen deutet auf eine signifikante zelluläre Funktion dieser Proteine hin.

Um zu überprüfen, ob die Fähigkeit zur Polymerisation ein generelles Merkmal der Bactofiline ist, wurden die subzelluläre Lokalisation und die biochemischen Eigenschaften von DUF583-enthaltenen Proteinen aus Bakterien anderer Klassen des Phylums Proteobacteria analysiert. Abbildung 3.16 zeigt ein Alignment aller im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Bactofilin-Homologe.



**Abbildung 3.16:** Alignment der untersuchten Bactofilin-Homologe. Die Sequenzen von *C. crescentus* CC1873 (AAK23848.1) und CC3022 (AAK24984.1, N-terminal verkürzt, siehe Abschnitt 3.1.1), *M. xanthus* MXAN4635 (ABF90865.1), MXAN4636 (ABF92433.1), MXAN4637 (ABF2206.1), MXAN7475 (ABF90589), *E. coli* YbcA (Q9JMT6) und *S. oneidensis* SO1662 (AAN54717) wurden mit Hilfe von ClustalX 2.0 angeordnet. Die Lage der Domäne DUF583 laut der Pfam-Datenbank ist markiert. Farbcode: hydrophobe Aminosäuren (hellblau), polare (grün), negativ geladene (violett), positiv geladene (orange), Prolin (gelb) und Glycin (braun).

Begonnen wurde die Analyse mit vier bis dahin nicht charakterisierten Bactofilin-Paralogen aus dem  $\delta$ -Proteobakterium *Myxococcus xanthus* (Abbildung 3.17A). *M. xanthus* ist ein stäbchenförmiges Bodenbakterium, das genetisch zugänglich ist und sich so für molekularbiologische Studien anbietet [175]. Nach dem Ersetzen der entsprechenden endogenen Gene für die Bactofiline mit Allelen, die für Fluoreszenzproteininfusionen codierten, konnten auffällige filamentöse Strukturen in allen vier konstruierten Stämmen nachgewiesen werden (Abbildung 3.17B). MXAN4635, MXAN4636 und MXAN4637 zeigten ein sehr ähnliches Lokalisationsmuster mit kurzen Filamenten, die vor allem im medialen Teil der Zelle parallel zur Längsachse verlaufen. Dieses Ergebnis und der Umstand, dass die entsprechenden Gene einander überlappen und dadurch sehr wahrscheinlich co-exprimiert werden [66], lässt vermuten, dass die drei Proteine miteinander interagieren. Die durch das vierte Protein (MXAN7475) gebildeten Strukturen waren ungleichmäßiger als diejenigen der anderen Paraloge und zogen sich meist durch die gesamte Zelle.

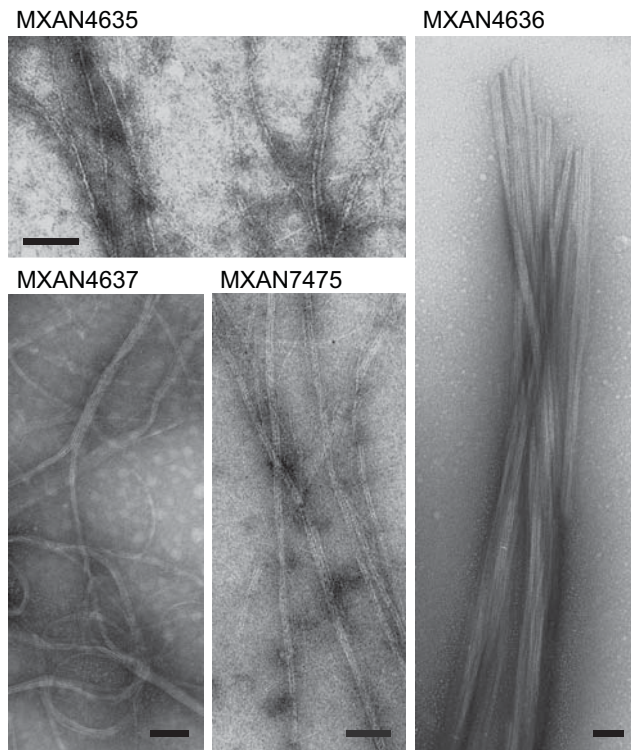


**Abbildung 3.17:** Bactofilin-Paraloga in *M. xanthus*. **A)** Schematische Darstellung der vier homologen Proteine. Die Domäne DUF583 ist in Schwarz abgebildet, während die Prolin-reichen Sequenzen in MXAN4636 und MXAN7475 Gelb eingefärbt sind. **B)** Subzelluläre Lokalisation der Bactofilin-Homologe in *M. xanthus*. Zellen der Stämme MT296 (MXAN4635-*mCherry*), MT297 (MXAN4636-*mCherry*), MT298 (MXAN4637-*mCherry*) und MT299 (MXAN7475-*mCherry*) wurden in CTT-Medium angezogen und mittels DIC- und Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Balken: 2 µm. (Aufnahmen Martin Thanbichler).

In Übereinstimmung mit ihrer Filament-artigen Lokalisation waren alle vier Bactofiline in der Lage, nach heterologer Expression in *E. coli* und Reinigung der entsprechenden Proteine ohne Zusatz von Co-Faktoren zu polymerisieren (Abbildung 3.18). Dafür wurden Fusionen der vier Paraloga an Hexahistidin in *E. coli* produziert. MXAN4635, MXAN4637 und MXAN7475 wurden denaturierend in Gegenwart von 8 M Harnstoff aufgereinigt und durch schrittweises Entfernen des Harnstoffs rückgefaltet, wohingegen MXAN4636 durch Niedriggeschwindigkeits-zentrifugation angereichert wurde. Die aufgereinigten Proteine bildeten ausgedehnte Netzwerke aus langen, meist geraden Polymeren, die nur aus wenigen, lateral zusammengelagerten Protofilamenten zusammengesetzt waren. Eine Ausnahme bildete hier MXAN4636, welches massive Bündel ausbildete. Diese Experimente zeigen einmal mehr, dass Bactofiline die generelle Disposition zum Ausbilden filamentöser Strukturen besitzen - *in vivo* und *in vitro*.

Die Zellmorphologie einer *M. xanthus*-Mutante, der alle vier Bactofilin-Gene fehlen ( $\Delta$ MXAN4635-7  $\Delta$ MXAN7475, JK328), zeigte keine besonderen Veränderungen (Abbildung 3.19B). Da die Gene für MXAN4635-7 aber in direkter Nachbarschaft zu Genen liegen, die mit Bewegung auf Oberflächen in Zusammenhang gebracht werden [197, 198], wurde der Effekt einer Deletion dieser Gene auf Zellbewegungen untersucht. *M. xanthus* besitzt zwei verschiedene Antriebsarten, die beide eine zentrale Rolle während der Entwicklung spielen, da sie die Aggregation der Zellen in Fruchtkörpern koordinieren [161]. Die sogenannte A-Motilität nutzt polare Schleimsekretion und fokale Adhäsionskomplexe, um die einzelne Zelle auf einer festen Oberfläche vorwärts zu bewegen, während die S-Motilität die gerichtete

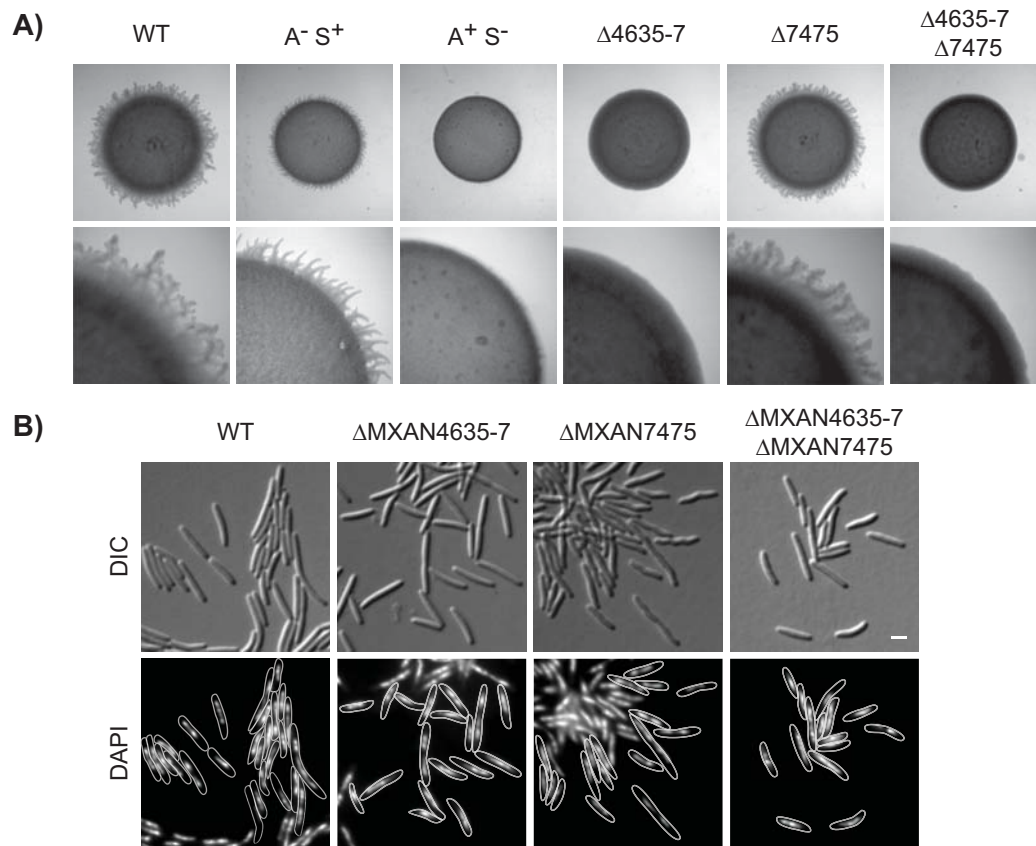




**Abbildung 3.18:** Polymere Struktur der *M. xanthus*-Paralogue *in vitro*. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der Polymere, die durch die denaturierend aufgereinigten und rückgefalteten Proteine gebildet werden. Zur Visualisierung wurden die Proteine mit 2 % Uranylacetat behandelt (Negativkontrastierung). Balken: 75 nm (Aufnahmen in Kooperation mit Erhard Mörschel)

Bewegung mehrerer Zellen durch Typ IV-Pili vermittelte Zell-Zell-Kontakte ermöglicht. Tatsächlich zeigte eine MXAN4635-7-Deletionsmutante ( $\Delta$ MXAN4635-7, MT295) eine stark beeinträchtigte S-Motilität auf 0,5 % CTT-Festmedium (Abbildung 3.19A). Einzelzellbewegungen waren dagegen nicht beeinflusst, was mit Hilfe von 1,5 % CTT-Festmedium und auch durch die Beobachtung von individuellen Zellen im Lichtmikroskop nachgewiesen wurde (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu scheint eine Deletion von MXAN7475 keinen Einfluss auf die Zellbewegungen zu besitzen und das Protein möglicherweise andere Funktionen in der Zelle zu vermitteln. Um diese näher zu untersuchen, wurde die Genregion um MXAN7475 genauer betrachtet. Hier zeigte sich, dass MXAN7475 wahrscheinlich in einem Operon mit Genen liegt, die für ParB-ähnliche (MXAN7476) oder ParA-ähnliche (MXAN7477) Proteine codieren. Da diese Proteine an der Chromosomensegregation beteiligt sind, wurden Wildtyp *M. xanthus* Zellen sowie alle generierten Deletionsstämme mit Hilfe einer 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) Färbung auf Veränderungen in der DNA-Verteilung der Zellen analysiert (Abbildung 3.19B). Hier konnten keine Unterschiede zwischen dem Wildtyp-Stamm und den verschiedenen Deletionsstämmen festgestellt werden, so dass die Funktion von MXAN7475 in der Zelle weiter ungewiss bleibt.

Zur Analyse weiterer Bactofilin-Homologe wurden Bakterien der Klasse  $\gamma$ -Proteobacteria ausgewählt. In *Escherichia coli* ist ein Bactofilin-Homolog annotiert, welches aber nicht im Chromosom, sondern auf dem F-Plasmid (Fpla015) codiert ist. Das Protein, das als YbcA (YuaD) annotiert ist, weist (wie es für Enterobakterien typisch ist) zwei N-terminale Transmembrandomänen auf (Abbildung 3.20A). Der Rest des Proteins wird vor allem von der

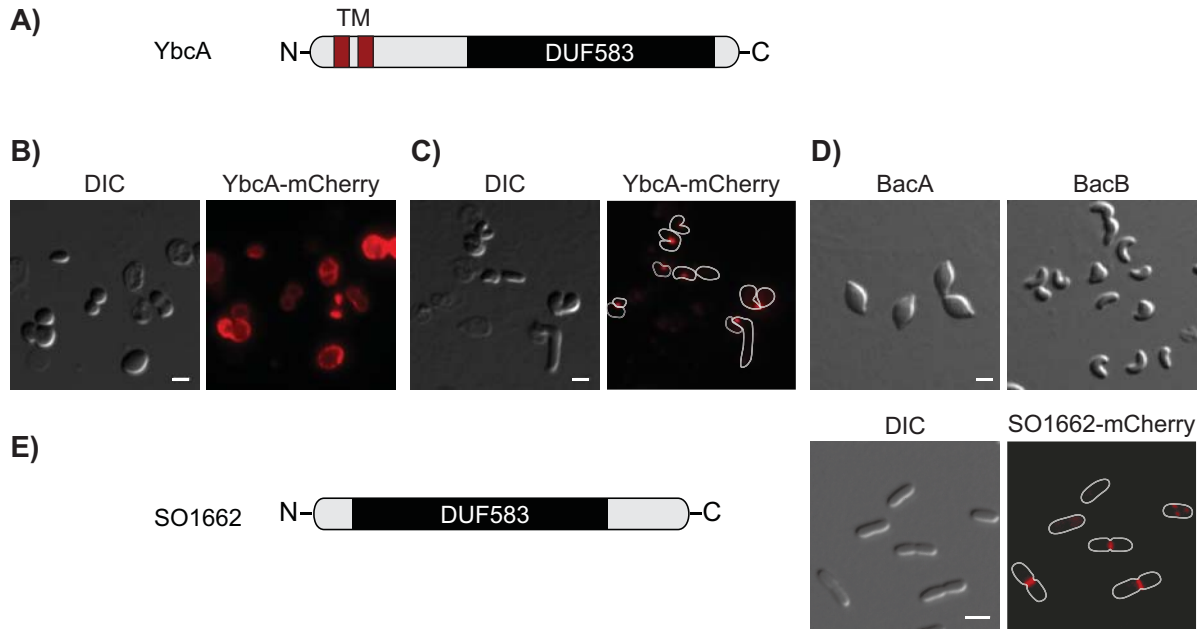


**Abbildung 3.19:** Phänotyp der *M. xanthus*-Deletionsmutanten. **A)** Einfluss von MXAN4635-7 auf S-Motilität. Die Stämme DK1622 (Wildtyp), DK1217 (*aglB1*; A<sup>-</sup> S<sup>+</sup>) [82], DK10416 (*pilB*; A<sup>+</sup> S<sup>-</sup>) [196], MT295 (ΔMXAN4635-7), MT300 (ΔMXAN7475) und JK328 (ΔMXAN4635-7 ΔMXAN7475) wurden in CTT-Medium angezogen, auf 0,5% Agar-haltiges CTT-Festmedium aufgetropft und nach 24 h auf Motilität untersucht. Strahlenförmige Strukturen ausgehend vom Rand der Kolonie weisen auf Zellen hin, die sich über S-Motilität bewegen. **B)** Untersuchung der Chromosomensegregation in den Deletionsstämmen. Die Stämme DK1622, MT295, MT300 und JK328 wurden auf CTT-Medium angezogen und die DNA mittels DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) angefärbt. Die Zellen wurden auf mit 1% Agarose in Wasser beschichtete Objektträger transferiert und DIC- und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Balken: 2 μm.

Domäne DUF583 gebildet, die vermutlich in Richtung Zytoplasma orientiert ist. Die Produktion eines Fusionsproteins YbcA-mCherry in einem *E. coli*-Stamm, der kein F-Plasmid trägt und somit auch keine endogene Kopie von *ybcA* aufweist, führte innerhalb kürzester Zeit zu starken morphologischen Veränderungen und zur Lyse der Zellen (Abbildung 3.20B). Da die Expression von *ybcA-mCherry* über einen Arabinose-induzierbaren Promotor gesteuert werden konnte, wurde die Lokalisation des Fusionsproteins bei möglichst geringer Proteinmenge untersucht. Hier zeigte sich, dass die normalerweise stäbchenförmigen Zellen überall da, wo YbcA-mCherry lokalisiert, abknicken oder sich abrunden (Abbildung 3.20C). Das beobachtete Verhalten erinnert an den Phänotyp bei Überproduktion von BacAB in *C. crescentus* und lässt auf einen ähnlichen Mechanismus schließen. Auffällig ist dabei aber, dass die Morphologieänderung im verwendeten *E. coli*-Stamm sehr schnell zur Zelllyse führte, was möglicherweise auf einen Mangel an Regulationsmechanismen für das nicht endogen codierte Bactofilin-Homolog zurückzuführen ist. Dies ist auch vereinbar mit der Beobachtung, dass die artifizielle Produktion von BacA oder BacB aus *C. crescentus* in *E. coli* einen Verlust der Zellform bewirkte. Auch



hier bogen sich die Zellen oder rundeten sich ab, was später zur Zelllyse führte (Abbildung 3.20D). Mittels quantitativem Western Blot konnte gezeigt werden, dass die zelluläre Konzentration an BacA und BacB in diesen Stämmen 500- (für BacA) beziehungsweise 1000-fach (für BacB) höher war, als in einem Wildtyp *Caulobacter*-Stamm (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3.20:** Die Bactofilin-Homolog aus *E. coli* und *S. oneidensis*. **A)** Schematische Darstellung von YbcA aus *E. coli*. Die beiden Transmembrandomänen sind in Rot gehalten und die Domäne DUF583 in Schwarz. **B)** Lokalisation eines YbcA-mCherry-Fusionsproteins bei konventioneller Produktion. Ein Stamm mit dem Plasmid pJK44 ( $P_{BAD}$ -ybcA-mCherry) wurde in LB-Medium angezogen, für 1 h mit 0,1 % Arabinose induziert und mittels DIC- und Fluoreszenzmikroskopie analysiert. **C)** YbcA-Lokalisation bei geringer Proteinmenge. Der Stamm mit dem Plasmid pJK44 wurde in LB-Medium angezogen, für 1 h mit 0,01 % Arabinose induziert und DIC- und Fluoreszenzmikroskopisch untersucht. **D)** Effekt der Produktion von BacA oder BacB aus *C. crescentus* in *E. coli* TOP10. Stämme mit dem Plasmid pJK8 ( $P_{BAD}$ -bacA) oder pJK7 ( $P_{BAD}$ -bacB) wurden in LB-Medium angezogen, für 2 h (BacA) oder 5 h (BacB) mit 0,1 % Arabinose induziert und mittels DIC-Mikroskopie analysiert. **E)** Schematische Darstellung von SO1662 aus *S. oneidensis* (die Domäne DUF583 ist in Schwarz gehalten) und subzelluläre Lokalisation von SO1662. Zellen des Stammes MT288 (SO1662-mCherry) wurden in LB-Medium angezogen und mittels DIC- und Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Balken: 2  $\mu$ m.

Da *E. coli* kein chromosomal codiertes Bactofilin-Gen aufweist, wurde zur weiteren Analyse die verwandte Spezies *Shewanella oneidensis* ausgewählt, die ein einzelnes DUF583-enthaltenes Protein (SO1662) produziert (Abbildung 3.20E). Um die subzelluläre Lokalisation dieses Proteins zu studieren, wurde das endogene Gen durch eine SO1662-mCherry-Fusion ersetzt. Hier konnte gezeigt werden, dass SO1662 das typische Lokalisationsmuster eines Zellteilungsproteins aufweist. Abbildung 3.20E zeigt, dass in Zellen, die noch keine Einschnürungen aufweisen nur ein diffuses Fluoreszenzsignal oder stochastisch verteilte Punkte nachweisbar sind, wohingegen in Zellen kurz vor der Teilung (sichtbare Einschnürungen des Zellkörpers in der Zellmitte) ein Band auf Höhe der Teilungsebene sichtbar ist. Auch hier scheint das Bactofilin-Homolog also in der Lage zu sein, *in vivo* größere Strukturen zu bilden, wenn auch die Lokalisation und somit wahrscheinlich auch die Funktion sich von den zuvor untersuchten Proteinen abgrenzt. Leider war es nicht möglich, SO1662 in ausreichenden Mengen für weitere Untersuchungen zu isolieren, so dass eine Aussage zum Verhalten *in vitro* nicht getroffen werden kann.

## 3.2 Phosphatlimitierung in *C. crescentus*

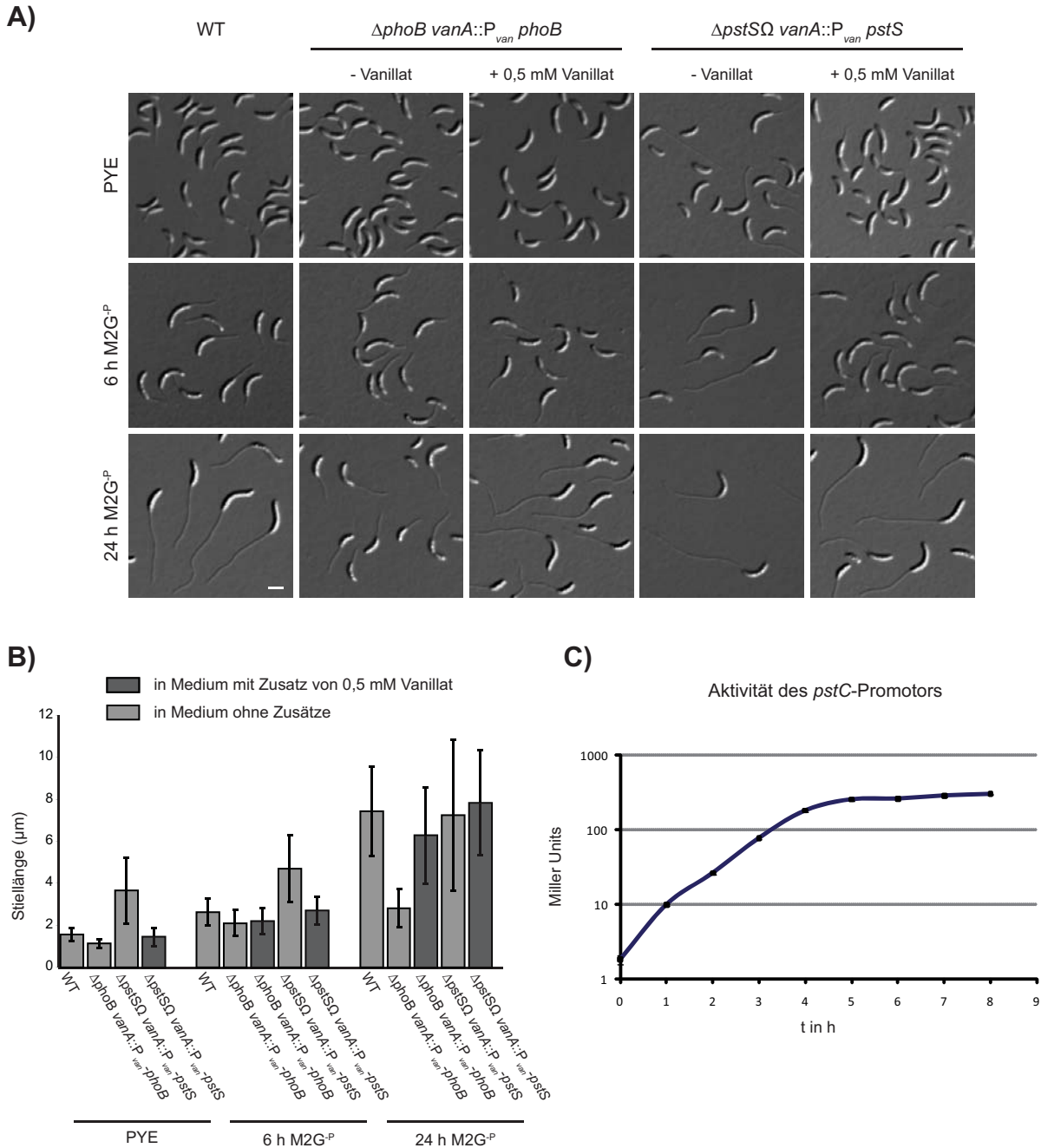
Der zweite Teil des Kapitels Ergebnisse befasst sich mit der Reaktion von *C. crescentus*-Zellen auf eine Verknappung des essentiellen Elements Phosphor, welches vor allem in Form von Phosphat in Zellen aufgenommen wird. Durch Transkriptom-Analysen sollte die Adaption des Organismus an die Nährstofflimitierung untersucht werden und so möglicherweise die Ursache der unter diesen Bedingungen auftretenden morphologischen Veränderungen näher charakterisiert werden.

### 3.2.1 Regulation der Transkription als Antwort auf Phosphatmangel

Das  $\alpha$ -Proteobakterium *C. crescentus* ist vor allem in Frischwasser-Seen und Flüssen zu finden, also in Habitaten, die durch ein geringes Angebot an Nährstoffen charakterisiert sind. So ist zum Beispiel die Menge an Phosphor, einem essentiellen Element, das zur Synthese von Nukleinsäuren und Phospholipiden dient, oft Wachstums-limitierend in diesen Ökosystemen. Interessanterweise tritt neben einem stark verlangsamten Wachstum auch eine Veränderung der Morphologie von *Caulobacter*-Zellen als Antwort auf geringe Phosphatmengen in der Umgebung auf. Kulturen, die in Medium mit einer Phosphatkonzentration von weniger als 30  $\mu\text{M}$  angezogen werden, weisen so zum Beispiel eine bis zu 30  $\mu\text{m}$  lange Prostheka auf [155], während die Länge bei Kultivierung in Komplexmedium bei circa 1 – 2  $\mu\text{m}$  liegt.

Durch eine gezielte Deletion von Genen, die in *C. crescentus* an der Phosphataufnahme oder der involvierten Signaltransduktion beteiligt sind, kann diese Änderung der Zellform beeinflusst werden. Insbesondere konnte in einer Studie von Gonin et al. [68] gezeigt werden, dass die Zerstörung der Gene *pstS* (CC1515) und *phoB* (CC0294) zur Dysregulation der Antwort auf Phosphatmangel führt. Die Aufnahme von Phosphat in die Zelle ist in einem Stamm, der das periplasmatische Protein PstS nicht mehr produzieren kann, stark eingeschränkt. PstS bindet mit hoher Affinität anorganisches Phosphat und ermöglicht den Transport über die innere Membran. Ist kein funktionelles PstS im Periplasma vorhanden reagiert die Zelle also trotz hoher Phosphatkonzentration im Medium (Anzucht in Komplexmedium) wie unter Phosphatmangel. Dies lässt sich durch Verlängerung eines des Stiels mikroskopisch detektieren. Auf der anderen Seite führt eine Deletion des Transkriptionsregulators *phoB* zu einem Abbruch in der Signaltransduktion, welche die Detektion von geringen Konzentrationen an Phosphat in der Umgebung der Zelle mit einer Antwort auf Transkriptionsebene koppelt. Die Zellen können in diesem Fall nur noch eingeschränkt auf einen Mangel an Phosphat reagieren, was sich morphologisch durch kurze Zellfortsätze auch bei Kultivierung in Medium ohne Phosphatquelle widerspiegelt [68].

Als Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen wurden Deletionen der endogenen Gene *phoB* und *pstS* im Wildtyp-*Caulobacter*-Stamm CB15N erstellt. Beide Stämme zeigten den erwarteten Phänotyp und ließen sich durch Integration einer Kopie des Gens am *vanA*-Locus komplementieren (Abbildung 3.21A und B). Zwar waren schon 6 h nach Inokulation der Zellen in  $\text{M2G}^{-\text{P}}$ -Medium morphologische Veränderungen sichtbar (die Prosthecae der meisten Stämme verlängerten sich auf das Doppelte), die Unterschiede zwischen Wildtyp und  $\Delta\textit{phoB}$ -Stamm wurden aber erst nach Kultivierung der Zellen für 24 h in diesem Medium deutlich.



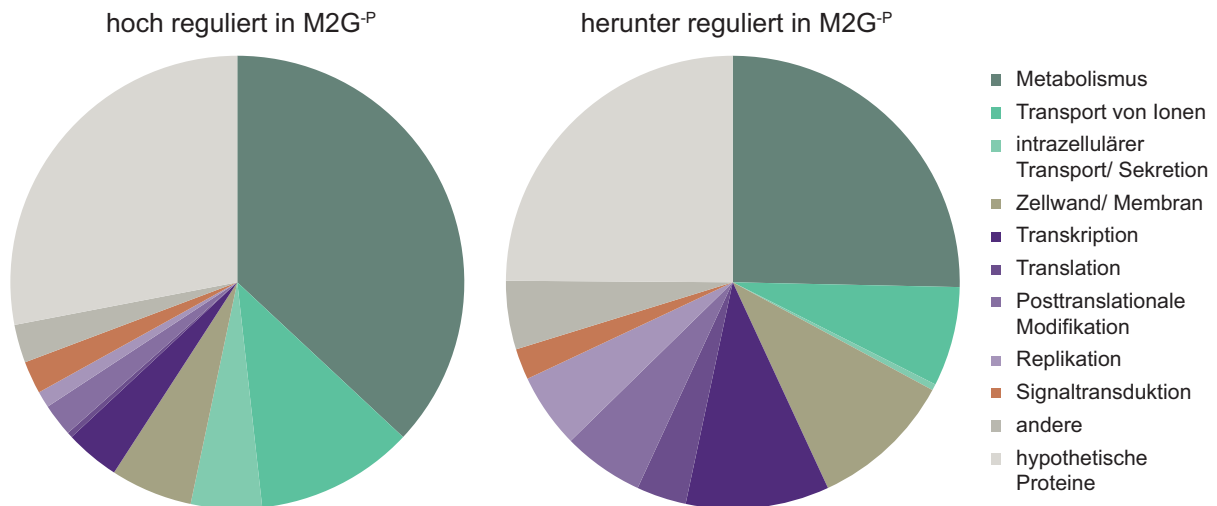
**Abbildung 3.21:** Phänotyp der für die Transkriptomstudien verwendete Stämme. **A)** Die Stämme CB15N (Wildtyp), JK61 ( $\Delta phoB$  *vanA::P<sub>van</sub>-phoB*) und JK161 ( $\Delta pstS\Omega$  *vanA::P<sub>van</sub>-pstS*) wurden in PYE-Medium angezogen und 1:20 in M2G<sup>-P</sup>-Medium (wenn erforderlich mit Zusatz von 0,5 mM Vanillat) überführt. Die Morphologie der Zellen wurde mittels DIC-Mikroskopie zu den angegebenen Zeitpunkten analysiert. Balken: 2  $\mu$ m. **B)** Graphische Darstellung der Stiellänge untersuchter Zellen. Um die Unterschiede hervorzuheben, wurden die Länge der Prostheken von jeweils 100-200 Zellen mit Hilfe von MetaMorph ausgemessen und die Ergebnisse in einem Diagramm dargestellt. **C)** Bestimmung der Promotoraktivität mittels  $\beta$ -Galactosidase-Assay. Ein Stamm, der das Plasmid pJK18 (*pstC*-Promotor-*lacZ*) trägt, wurde in PYE-Medium bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von > 1,5 angezogen und 1:20 in M2G<sup>-P</sup>-Medium verdünnt. Stündlich wurden Proben genommen und die Promotoraktivität mittels  $\beta$ -Galactosidase-Assay bestimmt. Die aufgetragenen Werte sind Mittelwerte von Dreifach-Bestimmungen (Anmerkung: Standardabweichung kleiner als Auflösung des Diagramms), außerdem wurde das Experiment insgesamt dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

Als Antwort auf einen Mangel an Phosphat wird der Transkriptionsregulator PhoB aktiviert, der an spezifische Sequenzen (so genannte Pho-Boxen) in Promotorregionen bindet und die Transkription der betreffenden Gene reguliert. Zwei dieser Pho-Boxen liegen *upstream* von *pstC*, von dem bekannt ist, dass die Transkription positiv durch PhoB reguliert wird [68]. Um nun die Zeit besser eingrenzen zu können, die *C. crescentus*-Zellen nach Überführen in phosphatfreies Medium benötigen, um auf Transkriptionsebene zu reagieren, wurde die Promotorregion von *pstC* auf einem in *C. crescentus* replizierenden Plasmid an das *lacZ*-Gen fusioniert. Das so konstruierte Plasmid (pJK18) ermöglichte die Bestimmung der Promotoraktivität mittels  $\beta$ -Galactosidase-Assay. In Zellen, die mit pJK18 transformiert worden waren, konnte bei Kultivierung in PYE-Komplexmedium keine Aktivität des *pstC*-Promotors detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu zeigten Zellen, die in Komplexmedium bis zur stationären Phase angezogenen und in phosphatfreies Medium überimpft wurden, einen Anstieg der Promotoraktivität bis nach spätestens 6 h ein Plateau erreicht wurde (Abbildung 3.21C). Wie zu erwarten war, verzögerte sich die Aktivierung des Promotors, wenn die aus Komplexmedium überführten Zellen noch in der exponentiellen Wachstumsphase waren (Daten nicht gezeigt). In diesem Fall werden noch vorhandene Phosphatquellen aus dem Komplexmedium verschleppt, erst nach deren Abbau tritt ein Mangel an Phosphat auf.

Unter Verwendung der Erkenntnisse aus diesen Versuchen wurde eine Auswahl an Proben getroffen, mit denen die Genregulation in *C. crescentus*-Zellen als Antwort auf Phosphatmangel untersucht werden sollte: Die drei Stämme Wildtyp (CB15N), JK61 ( $\Delta phoB$  *vanA::P<sub>van</sub>-phoB*) und JK161 ( $\Delta pstS\Omega$  *vanA::P<sub>van</sub>-pstS*) wurden in PYE-Komplexmedium und nach Kultivierung für 1, 2,5 und 6 h in M2G<sup>-P</sup>-Medium geerntet und zur Isolation von RNA verwendet. Zusätzlich wurden Proben der Stämme JK61 und JK161 nach Komplementation durch Zugabe von 0,5 mM Vanillinsäure (Vanillat) ausgewählt.

Abbildung 3.22 zeigt eine graphische Darstellung der Transkriptionsregulation von Wildtypzellen nach Überimpfen vom PYE-Medium in M2G<sup>-P</sup>-Medium. Insgesamt sind fast 500 Gene konstant zu allen drei getesteten Zeiten reguliert (eine detaillierte Auflistung der Daten liefern die Tabellen 5.4 und 5.5 im Anhang). Dabei steigt die Expression von 255 Transkripten im Vergleich zur Kultivierung in Komplexmedium, während die Expression von 224 Genen sinkt. Um eine bessere Übersicht über die Funktion der codierten Proteine zu erhalten, wurden die Gene nach der zugehörigen COG-Klassifizierung sortiert. COG steht für *Cluster of orthologous groups* und bezeichnet eine Gruppierung von Proteinen durch Vergleiche von Sequenzen aus komplett sequenzierten Genomen aller bedeutenden phylogenetischen Linien, um die Funktion anhand konservierter Domänen vorherzusagen.

Über 50% aller nach einem Medienwechsel induzierten Gene sind für Stoffwechselprozesse oder den Transport anorganischer Substanzen von Bedeutung. Bei einer Kultivierung von Zellen in Komplexmedium sind Aminosäuren die Hauptkohlenstoffquelle, während in Minimalmedium der zugesetzte Zucker (in diesem Fall Glukose) als C-Quelle fungiert. Dies lässt sich auch aus den Transkriptionsdaten erkennen. In M2G<sup>-P</sup>-Medium werden Gene zur Aminosäurebiosynthese induziert (zum Beispiel die Gene für eine Glutaminsynthetase [CC1969], Glutamatsynthetase [CC3606-7] oder Cysteinsynthetase [CC3625]), während Gene, die mit



**Abbildung 3.22:** Auswertung der Transkriptom-Analyse. Graphische Darstellung der Transkriptionsregulation nach Inokulation von Wildtyp-*Caulobacter*-Zellen in M2G<sup>-P</sup>-Medium. Gewählt wurden die zu allen der drei zuvor festgelegten Zeiten regulierten Gene, diese wurden nach Funktion (COG-Klassifizierung, siehe Text) gruppiert.

Aminosäureabbau in Zusammenhang gebracht werden (zum Beispiel Gene assoziiert mit dem Histidinabbau [CC0957-9]) reprimiert sind. Des weiteren werden verschiedene Gene zur Ammonium- und Sulfat-Assimilation sowie Kaliumtransporter induziert, was insgesamt in Übereinstimmung mit veröffentlichten Daten zur Transkriptionsregulation von *C. crescentus* im Vergleich von Komplexmedium (PYE) und Minimalmedium (M2G) steht [83]. Auffällig ist ebenfalls die verringerte Expression von Genen mit Bezug zur Proteinbiosynthese. Circa  $\frac{1}{4}$  aller nach dem Transfer der Zellen in M2G<sup>-P</sup>-Medium herunter regulierten Gene fallen in die Gruppen Translation (ribosomale Proteine), posttranslationale Modifikation und Chaperone. In Übereinstimmung mit einem verlangsamten Stoffwechsel und Wachstum der Zellen sind weiterhin Gene, deren Produkte an Replikation und DNA-Reparatur beteiligt sind, vermindert exprimiert.

Aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung der verwendeten Medien (Komplexmedium im Vergleich zu einem Minimalmedium) wird demnach eine Vielzahl von Genen reguliert, bei denen kein direkter Zusammenhang zu einem Mangel an Phosphat besteht. Dies erschwert die Suche nach interessanten Transkripten, welche durch Limitierung von Phosphat differentiell exprimiert werden.

Eine Alternative, die Transkriptionsregulation als Antwort auf das Fehlen von Phosphat zu untersuchen, ohne die Zellen in ein anderes Medium zu überführen, ist durch Verwendung eines *pstS*-Deletionsstammes gegeben. Hierfür wurde die Expression von Genen im Wildtypstamm bei Kultivierung in PYE-Medium mit entsprechenden Daten des Stammes JK161 in identischem Medium zu verglichen. Diesem Stamm fehlt, wie schon erwähnt, das phosphatbindende Protein PstS im Periplasma, so dass auch bei Kultivierung in einem Komplexmedium nicht genügend anorganisches Phosphat aufgenommen werden kann. Durch Analyse der Expressionsdaten der beiden Stämme konnten Gene identifiziert werden, die spezifisch als Antwort



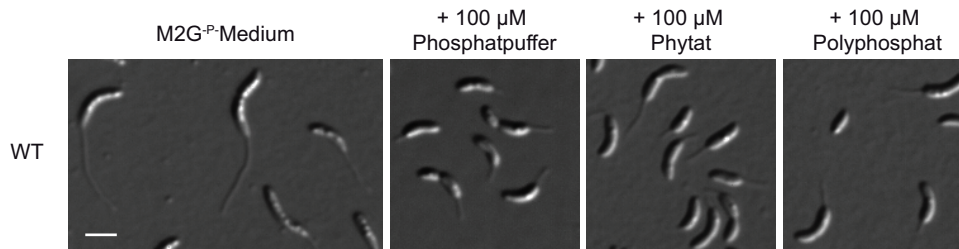
auf einen Phosphatmangel und nicht allein durch den Transfer von Komplex- zu Minimalmedium reguliert werden (eine Liste befindet sich in den Tabellen 5.6 und 5.7 im Anhang). Mit Hilfe dieser Betrachtung lässt sich der Anteil von Genen assoziiert mit metabolischen Prozessen stark eingrenzen, wohingegen die Menge von an Transportvorgängen beteiligten Genen konstant bleibt. Zum Vergleich wurden die im *pstS*-Deletionsstamm regulierten Gene in den Tabellen zur Regulation im Wildtyp nach Medienwechsel (Tabelle 5.4 und 5.5) markiert.

Unter den in einem *pstS*-Deletionsstamm differentiell regulierten Genen befinden sich *pstC*, *pstA* und *pstB*, die für die Bestandteile des PstCAB-Komplex codieren und für die Aufnahme von anorganischem Phosphat von Bedeutung sind. Ebenso sind viele für TonB-abhängige Rezeptoren codierende Gene induziert. Diese Proteine bilden ein alternatives Transportsystem in Gram-negativen Bakterien und spielen eine Rolle bei der gerichteten, das heißt energieabhängigen Substrataufnahme [96, 115]. Von den 67 im Genom annotierten TonB-abhängigen Rezeptoren sind unter Phosphatmangel 12 induziert und 3 reprimiert. Zusätzlich konnte die positive Regulation des in *C. crescentus* bisher nicht charakterisierten Typ II-Sekretionssystems nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 3.2.4).

Bakterien sind normalerweise nicht in der Lage, Phosphat in organischen Verbindungen direkt aufzunehmen, sondern müssen anorganisches Phosphat ( $P_i$ ) erst durch Hydrolyse der organischen Phosphatquellen frei setzen [145]. Dies geschieht zum Beispiel über die Synthese von unspezifischen Phosphatasen im Periplasma Gram-negativer Zellen - in *E. coli* ist hierfür vorwiegend die alkalische Phosphatase Bap (codiert durch das Gen *phoA*) verantwortlich. In Übereinstimmung mit einer Erhöhung der Phosphatfreisetzung bei einer Verknappung an Phosphor, konnte die Induktion von Genen für eine Vielzahl von Phosphatasen, Phosphodiesterasen und Nukleasen im  $\Delta pstS$ -Stamm oder bei Kultivierung von Wildtyp-Zellen in  $M2G^{-P}$ -Medium ausgemacht werden. So sind zum Beispiel die Gene für zwei von drei im *Caulobacter*-Genom codierten alkalischen Phosphatasen verstärkt exprimiert. Um nun zu überprüfen, ob *C. crescentus*-Zellen unter Phosphatmangel in der Lage sind,  $P_i$  aus polymeren Phosphatverbindungen freizusetzen und für den eigenen Stoffwechsel zu verwenden, wurden Zellen des Wildtypstammes CB15N in  $M2G^{-P}$ -Medium mit Zusatz von Phytat oder Polyphosphat kultiviert. Diese beiden Verbindungen stellen neben Phosphonaten einen großen Teil der natürlich vorkommenden organischen Phosphatverbindungen dar. Alle eukaryotischen und prokaryotischen Zellen enthalten Polyphosphate, die als Energiereserve, aber auch für regulatorische Prozesse genutzt werden [100]. Dabei kann der Polymerisationsgrad stark variieren. Es existieren kurzkettige Verbindungen (Oligophosphate wie Pentanatriumphosphat) bis hin zu Polymeren aus mehreren Tausend Phosphatmolekülen. Phytat dagegen ist eine nur von Pflanzen genutzte Speicherform für Phosphat. Bakterien können diese durch Produktion des Enzyms Phytase abbauen und so anorganisches Phosphat freisetzen. Auch im Genom von *C. crescentus* ist ein solches Enzym codiert (CC1295), dessen Expression im  $\Delta pstS$ -Stamm sowie in Wildtyp-Zellen nach 2,5 und 6 h Inkubation in phosphatfreiem Medium signifikant verstärkt ist. Abbildung 3.23 zeigt, dass *Caulobacter*-Zellen in der Lage sind, beide Polymere als Quelle für anorganisches Phosphat zu nutzen und eine für phosphathaltiges Medium typische Zellform anzunehmen.

Neben den an der Aufnahme von Phosphat beteiligten Genprodukten scheinen auch Proteine mit Funktionen für andere zelluläre Prozesse unter Phosphatmangel verstärkt



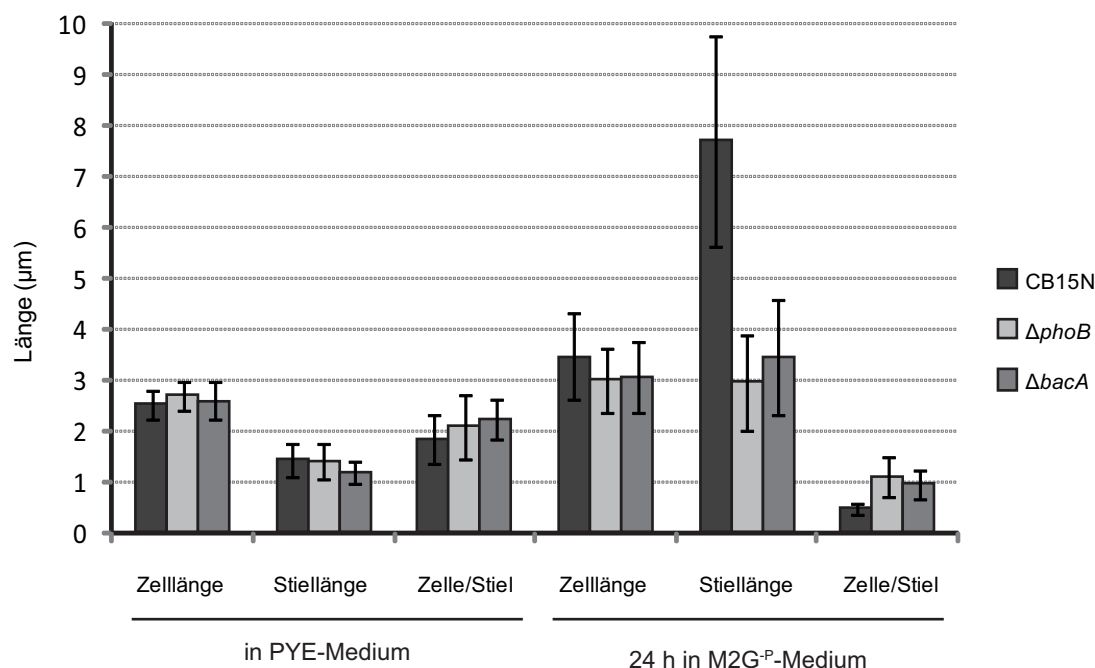


**Abbildung 3.23:** Umsetzung von polymeren Phosphatverbindungen durch *C. crescentus*. Zellen des Wildtypstammes CB15N wurden in PYE-Komplexmedium angezogen und 1:20 in M2G<sup>-P</sup>-Medium mit oder ohne Zusatz einer Phosphatquelle verdünnt. Als Positivkontrolle für ein Minimalmedium mit ausreichender Phosphatmenge wurde dem M2G<sup>-P</sup>-Medium 100 µM Phosphatpuffer (pH 7,0) zugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 20 h wurde die Morphologie der Zellen mittels DIC-Mikroskopie analysiert. Balken: 2 µm.

produziert zu werden. So sind die Gene für mehrere Transkriptionsfaktoren sowie mit der Signaltransduktion assoziierte Gene induziert. Wie erwartet konnte unter Phosphatmangel eine Induktion des Gens *phoB* festgestellt werden. Auffällig dagegen ist die stark erhöhte Expression des Gens für den MarR-ähnlichen Transkriptionsfaktor CC3677 (siehe Abschnitt 3.2.3). Ebenfalls interessant ist die Induktion von Genen für zwei GGDEF-Domänen enthaltende Proteine sowie für ein ParA-ähnlichen Protein. GGDEF-Proteine bestimmen die Konzentration des Botenstoffs (3',5')-zyklisches di-Guanosinmonophosphat (c-di-GMP) in der Zelle und können so den Übergang zwischen Motilität und Sessilität, Biofilmbildung oder die Produktion von Virulenzfaktoren steuern [77]. Dagegen werden ParA ATPasen mit der Segregation von Plasmiden oder chromosomaler DNA in Verbindung gebracht [171]. Die verminderte Expression einiger Transkriptionsfaktoren vor allem aus der TetR-Familie sowie die Repression von mehreren kleinen, nicht-codierenden RNAs konnte ebenfalls demonstriert werden. Vertreter der Tet-Repressor (TetR) -Transkriptionsfaktoren wurden in verschiedenen Bakterien charakterisiert und kontrollieren Gene, deren Produkte an katabolischen Prozessen beteiligt sind, der Antwort auf osmotischen Stress oder der Regulation von Virulenzfaktoren wie Antibiotikaproduktion und Ausprägung von Multiresistenzen [144]. In *C. crescentus* konnten 26 TetR-Proteine identifiziert werden, wobei die Funktion der einzelnen Transkriptionsfaktoren noch unklar ist. Die fünf vermindert exprimierten intergenen Regionen wurden als potentielle kleine RNAs (sRNAs) beschrieben [103]. Ihre Rolle in der Zelle wurde bisher nicht untersucht, bakterielle sRNAs konnten aber schon mit der zellulären Antwort auf die Änderung von Umweltbedingungen in Verbindung gebracht werden.

Unter Phosphatmangel wird eine Fülle von bisher nicht charakterisierten Genen induziert, die erfolgversprechende Kandidaten auf der Suche nach Faktoren der Stielmorphogenese sind. Bemerkenswert ist dabei die verstärkte Expression des Gens CC1873, welches für das im ersten Teil dieser Arbeit beschriebene Protein BacA codiert. Dieses Gen wird im Wildtyp-Stamm 2,5 und 6 h nach Überführen der Zellen auf M2G<sup>-P</sup>-Medium sowie im *pstS*-Deletionsstamm signifikant verstärkt transkribiert. Schon in Abbildung 3.13C konnte gezeigt werden, dass eine Deletion von *bacA* zu weniger stark verlängerten Zellfortsätzen bei Kultivierung unter Phosphatmangel führt. Ein Vergleich der Daten mit den Messwerten aus dem  $\Delta$ *phoB*-Stamm wies deutliche Übereinstimmungen auf. Um nun die relative Verkürzung der Prosthecae in

diesen beiden Stämmen besser einschätzen zu können, wurden die Länge des Zellkörpers von Stielzellen sowie die Länge des Fortsatzes in den Stämmen CB15N (Wildtyp), JK61 ( $\Delta phoB$  *vanA::P<sub>van</sub>-phoB*) und MT257 ( $\Delta bacA$ ) gemessen und das Verhältnis zwischen Zell- und Stiellänge bestimmt (Abbildung 3.24). Hier zeigte sich, dass die Länge des Zellkörpers und der Prostheka bei Kultivierung in PYE-Medium in allen drei Stämmen vergleichbar ist. Wurden die Zellen unter Phosphatmangel kultiviert, verlängerte sich der Zellkörper von Bakterien aller drei Stämme im gleichen Maße. Die Verlängerung des Stiels war dagegen nur im Wildtyp deutlich ausgeprägt, so dass in diesem Stamm das Verhältnis der Zell- zu Stiellänge von 1,9 in PYE-Medium auf 0,5 sank, während sich in den beiden Deletionsstämmen bei Phosphatmangel ein Verhältnis von 1 ergibt. Dies lässt darauf schließen, dass eine initiale Verlängerung des Zellkörpers und der Prostheka von dem eigentlichen Prozess der Stielverlängerung bei Detektion von Phosphatmangel abgegrenzt werden kann. Die darauf folgende, zusätzliche Verlängerung des Zellfortsatzes, scheint abhängig von BacA zu sein.



**Abbildung 3.24:** Graphische Darstellung der Längenverhältnisse in unterschiedlichen Stämmen. Die Länge des Zellkörpers und der Prostheka von 100-200 Zellen der Stämme CB15N, JK61 ( $\Delta phoB$  *vanA::P<sub>van</sub>-phoB*) und MT257 ( $\Delta bacA$ ) nach Kultivierung in PYE- oder M2G<sup>P</sup>-Medium wurde mit Hilfe von MetaMorph ausgemessen. Die jeweiligen Mittelwerte sowie das daraus berechnete Verhältnis zwischen Zell- und Stiellänge wurden in einem Diagramm dargestellt.

### 3.2.2 Identifikation von Genen des Pho-Regulon in *C. crescentus*

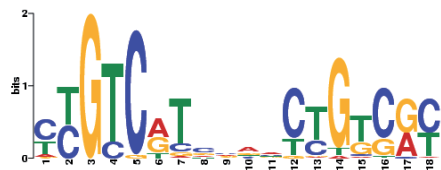
Der Großteil der unter Phosphatmangel in *E. coli* induzierten Gene wird durch den Transkriptionsregulator PhoB kontrolliert, weshalb die Gesamtheit dieser Gene auch als Pho-Regulon bezeichnet wird [187]. Da in *C. crescentus* eine Abhängigkeit der bei Phosphatlimitierung auftretenden morphologischen Veränderungen von PhoB nachgewiesen werden konnte [68],

sollten die in diesem Organismus durch PhoB kontrollierten Gene identifiziert werden. Dafür wurde die Transkriptionsregulation in einem  $\Delta phoB$ -Stamm (JK61) bei Kultivierung in  $M2G^{-P}$ -Medium untersucht. Durch einen Vergleich des erhaltenen Transkriptionsmusters mit den Daten des Wildtyp-Stammes an den drei zuvor gewählten Zeitpunkten (1, 2,5 und 6 h nach Inokulation), konnten Gene identifiziert werden, die nur im Wildtyp-Stamm nach Überführen der Zellen in  $M2G^{-P}$ -Medium reguliert werden, nicht aber bei Deletion des Gens für den Transkriptionsregulator PhoB (die jeweiligen Gene sind in den Tabellen 5.4 bis 5.7 im Anhang markiert). Insgesamt sind 50 der 255 im Wildtyp hoch regulierten Gene (19,6 %) und 9 der 224 herunter regulierten Gene (4,0 %) direkt oder indirekt abhängig von PhoB. Noch deutlicher wird das Verhältnis in dem  $\Delta pstS$ -Stamm. Hier sind 45 der 139 induzierten Transkripte (32,4 %) abhängig von PhoB und nur 2 der 77 reprimierten Gene (2,6 %). Dies entspricht auch der Aussage von VanBogelen et al. [176], dass PhoB vor allem als Aktivator wirkt. Die durch PhoB induzierten Gene sind analog zu den bisher besprochenen Daten vor allem an Transportprozessen beteiligt (*pstS*, Gene für TonB-abhängige Rezeptoren oder Komponenten des TypII-Sekretionssystems) oder dienen potentiell der Freisetzung von anorganischem Phosphat (Gene für Phosphatasen, Phosphodiesterasen, Nukleasen). Interessanterweise ist die Induktion von *pstCAB* unter Phosphatmangel in dem  $\Delta phoB$ -Stamm nicht beeinträchtigt, was auf einen zusätzlichen Mechanismus zur verstärkten Expression dieser Gene hindeutet.

Phosphoryliertes und somit aktiviertes PhoB interagiert mit einer spezifischen Sequenz in der Promotorregion von Genen. Dieses als Pho-Box bezeichnete Motiv ist zwischen unterschiedlichen Spezies teilweise stark konserviert [12, 125] und konnte in der Promotorregion von *pstC* und *pstS* in *C. crescentus* identifiziert werden [68]. Um Gene zu bestimmen, deren Transkription direkt durch PhoB kontrolliert wird, wurde im Genom von *C. crescentus* CB15 nach weiteren Pho-Boxen gesucht. Dafür wurde eine Matrix aus den fünf in diesem Organismus bekannten Sequenzen (zwei Sequenzen aus dem Promotor von *pstC* und drei von *pstS*) errechnet, wobei ein Motiv aus jeweils sieben konservierten Nukleotiden, getrennt durch vier nicht konservierte Basen, zugrunde gelegt wurde (Aufbau der verwendeten Datei: siehe Abschnitt 5.3 im Anhang). Mit Hilfe des FIMO (*find individual motif occurrences*)-Algorithmus der MEME Suite [14] konnte so für zwölf der durch PhoB induzierten Gene eine mutmaßliche Pho-Box nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.25). Zwei weitere der identifizierten Gene (CC2993 und CC3330) sind im  $\Delta phoB$ -Stamm deutlich verringert exprimiert, wenn auch nicht zu allen drei untersuchten Zeiten in signifikantem Maße.

Die Gene für drei der in *C. crescentus* unter Phosphatmangel induzierten TonB-abhängigen Rezeptoren gehören demnach zum Pho-Regulon sowie die Gene für mehrere zur Freisetzung von anorganischem Phosphat benötigte Enzyme (unspezifische Phosphatasen oder Endonukleasen) und an der Signaltransduktion oder Transkriptionsregulation beteiligte Proteine. Letztere könnten die Transkription unter Phosphatmangel weiter modulieren.

Interessant sind weiterhin die offenen Leserahmen (ORFs) CC2225, CC3329 und CC3330. Alle drei Gene codieren für hypothetische Proteine ohne bekannte funktionelle Domänen. Homologe zu den Genen CC3329/30 sind nur in den bisher sequenzierten Spezies der Gattung *Caulobacter* nachgewiesen worden, Homologe des konservierten Gens CC2225 sind vor



Gen	Produkt
CC0196	Isopropylmalat Isomerase Untereinheit
CC0221	hypothetisches Protein
CC0454	TonB-abhängiger Rezeptor
CC0608	mutmaßliches Lipoprotein
CC0722	TonB-abhängiger Rezeptor
CC0862	potentielle Endonuclease/ Exonuclease/ Phosphatase
CC0940	mutmaßliche Acylase
CC0995	TonB-abhängiger Rezeptor
CC1210	Protein aus der Cytochrom C Familie
CC1339	Stickstoff-regulatorisches Protein P-II 2
CC1375	mutmaßliche Phosphatase
CC1453	hypothetisches Protein
CC2066	Flagellen Basalkörper L-Ring Protein
CC2200	HNH Endonuclease
CC2225	hypothetisches Protein
CC2925	mutmaßliche saure Phosphatase
CC2993	Sensorhistidinkinase/Responsregulator
CC3329	hypothetisches Protein
CC3330	hypothetisches Protein
CC3677	Transkriptionsregulator der MarR-Familie
CC3741	mutmaßliche Import-Translocase der inneren Membran (Tim44 Untereinheit)

**Abbildung 3.25:** Identifikation verschiedener Gene mit potentieller Pho-Box in *C. crescentus*. Mit Hilfe des FIMO-Algorithmus wurde das Genom von *C. crescentus* nach Motiven für eine Pho-Box abgesucht. Dabei konnten neben *pstC* und *pstS* 21 weitere unter Phosphatmangel induzierte Gene mit einer potentiellen Pho-Box in der Promotorregion identifiziert werden - 12 davon werden in einem  $\Delta$ *phoB*-Stamm nicht mehr induziert (grün unterlegt), was eine direkte Regulation durch PhoB nahe legt. Die zwei Gene CC2993 und CC3330 (hellgrün markiert) sind in einem  $\Delta$ *phoB*-Stamm deutlich verringert exprimiert. Das auf der linken Seite abgebildete Logo der Consensussequenz für die Pho-Box wurde aus den identifizierten Sequenzen der unter Phosphatmangel induzierten Gene mit Hilfe von Weblogo [37] erstellt.

allein in Vertretern der Klasse  $\alpha$ -Proteobacteria zu finden. Auf der Suche nach Faktoren, die in *C. crescentus* für die Morphologieänderungen unter Phosphatmangel von Bedeutung sind, wurden diese drei Gene im Wildtypstamm CB15N deletiert. Keiner der so erhaltenen Stämme zeigte Auffälligkeiten der Zellform oder des Wachstums bei Kultivierung in Komplex- oder M2G<sup>-P</sup>-Medium, ebenso konnte keine spezifische Lokalisation eingeführter Fluoreszenzfusionsproteine ausgemacht werden (Daten nicht gezeigt). Eine Aussage über die Funktion dieser Proteine kann somit nicht getroffen werden. Eine Rolle für die Ausbildung des Stiels oder die Verlängerung des Zellkörpers unter Phosphatmangel erscheint aber unwahrscheinlich.

3.2.3 In *C. crescentus* wird die Transkriptionsregulation unter Phosphatmangel zusätzlich durch ein MarR-ähnliches Protein moduliert

Durch den Transfer in eine phosphatarme Umgebung werden in Wildtyp-*Caulobacter*-Zellen verschiedene Transkriptionsfaktoren induziert. Hervorstechend ist hier die im Vergleich zum Komplexmedium teilweise über zwanzigfach erhöhte Expression des Gens CC3677. Dieses codiert für ein 19,8 kDa großes Protein aus der Familie der MarR (*multiple antibiotic resistance*) Transkriptionsregulatoren, von denen insgesamt acht im Genom von *C. crescentus* zu finden sind. Die Vertreter dieser Familie von prokaryotischen Transkriptionsfaktoren koordinieren

die Antwort auf verschiedenste Umwelteinflüsse. Sie vermitteln Multiresistenzen gegen Antibiotika und andere für den Organismus toxische Substanzen wie organische Lösemittel und Desinfektionsmittel. Des weiteren regulieren sie die Antwort auf oxidativen Stress und die Verstoffwechselung von aromatischen Verbindungen. Von Bedeutung sind MarR-Homologe auch für Medizin und Landwirtschaft, da sie die Expression von Virulenzfaktoren wie zum Beispiel Efflux-Pumpen in Tier- und Pflanzen-pathogenen Mikroorganismen steuern [193]. In *Salmonella typhimurium* konnte eine Rolle des MarR Proteins SlyA für die Regulation der Hämolyisin- und Flagellenproduktion nachgewiesen werden [164].

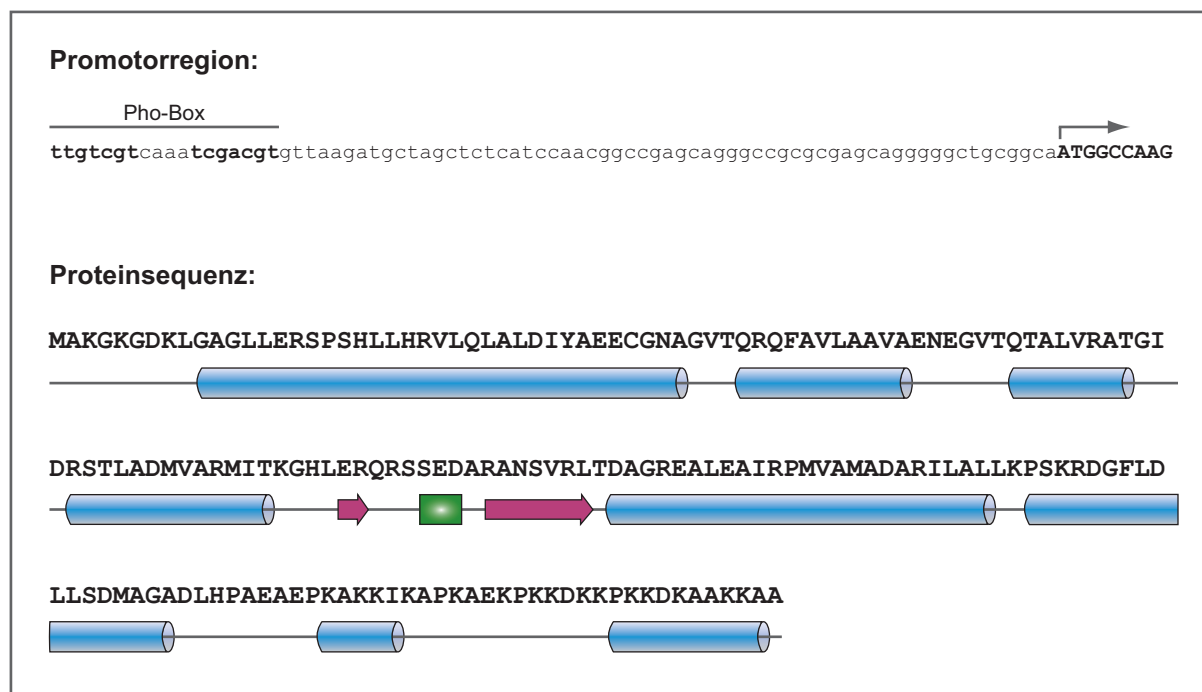
MarR-Proteine bilden Homodimere, die mit der DNA über ein charakteristisches Helix-turn-Helix-Motiv (wHTH für *winged helix-turn-helix*) interagieren, wobei palindromische Sequenzen unterschiedlicher Länge in Promotorregionen von Genen erkannt werden. Die transkriptionelle Regulation über MarR-Proteine kann mittels anionischer lipophiler (häufig phenolischer) Liganden moduliert werden, die die Fähigkeit der Homodimere, an spezifische DNA-Abschnitte zu binden, verringern können [4].

Das erste identifizierte Mitglied der Familie von MarR-Transkriptionsfaktoren ist ein negativer Regulator des *marRAB* Operon in *E. coli* [36]. Durch Kontrolle der Transkription von *marA*, welches für einen Transkriptionsaktivator der AraC Familie codiert, reguliert MarR die Expression von Antibiotikaresistenzfaktoren. MarR aus *E. coli* kann als Prototyp dieser Familie von Transkriptionsfaktoren angesehen werden. So wirken die meisten bisher charakterisierten MarR Proteine zum Beispiel als Repressor der Transkription [193].

Das Gen CC3677 besitzt eine potentielle Pho-Box in seiner Promotorregion (siehe Abbildung 3.25 und 3.26) und eine von PhoB abhängige Regulation des Gens CC3677 konnte durch einen Vergleich der Expressionsdaten zwischen Wildtyp-*C. crescentus*-Zellen und einem *phoB*-Deletionsstamm gezeigt werden. Die Daten aus der Microarray-Analyse deuten an, das CC3677 bei Kultivierung in Komplexmedium nicht exprimiert wird. Eine Deletion von CC3677 führt zu keinem auffälligen Defekt der Zellmorphologie oder der Vitalität wenn die Zellen in PYE-Komplexmedium oder M2G<sup>-P</sup>-Medium angezogen werden (Daten nicht gezeigt).

Um nun die Funktion von CC3677 bei Kultivierung von Zellen in phosphatarmen Medium näher zu untersuchen, wurden weitere Transkriptionsanalysen mittels Microarray durchgeführt. Dafür wurde die RNA des  $\Delta$ CC3677-Stammes (JK206) bei Wachstum der Zellen in PYE-Komplexmedium und nach Kultivierung für 6 h in M2G<sup>-P</sup>-Medium isoliert und mit analog behandelten Proben des Wildtyp-Stammes CB15N verglichen. Dabei zeigte sich, dass nur wenige der im Wildtyp-Stamm unter Phosphatmangel induzierten Gene in einem CC3677-Deletionsstamm ein anderes Expressionsmuster aufweisen (siehe Tabelle 3.1). Hierzu gehören Gene, die für eine Sirohäm-Synthase (CC1118) und ein potentiell mit der Stressantwort assoziiertes Protein (CC2267) codieren. Sirohäm ist eine funktionelle Gruppe in zytoplasmatischen Nitritreduktasen, die Nitrit mit NADH als Elektronendonator zu Ammonium reduzieren. Diese Enzyme werden unter Stickstoffmangel von Bakterien produziert. In Übereinstimmung mit der Induktion der Sirohäm-Synthase werden auch die entsprechenden für die Nitritreduktase in *C. crescentus* codierenden Gene (CC0615/16) unter den getesteten Phosphatmangel-Bedingungen induziert. Das Gen CC2267 codiert für ein hypothetisches Protein mit hoher Sequenzidentität zu Stressantwort-assoziierten Proteinen der Dabb-Familie. Die Funktion die-





**Abbildung 3.26:** Der MarR-ähnliche Transkriptionsregulator CC3677. Im oberen Teil der Abbildung sind die Promotorregion mit potentieller Pho-Box sowie der Transkriptionsstart von CC3677 dargestellt. Der untere Teil der Abbildung zeigt die Proteinsequenz und eine schematische Darstellung der Sekundärstruktur des Transkriptionsregulators. Die für wHTH-Proteine charakteristische Struktur aus einem *loop* (grüne Box) flankiert von  $\beta$ -Faltblättern (in Magenta) sowie  $\alpha$ -helikalen Bereichen (in Blau) wurden über Sequenzvergleiche zu MarR aus *E. coli* und durch Verwendung von APSSP2 [141] identifiziert und sind in Relation zur Proteinsequenz abgebildet.

ser Proteine ist noch nicht gänzlich aufgeklärt, es konnte aber gezeigt werden, dass Gene mit einer Dabb-Domäne in Pflanzen als Antwort auf Salz-Stress induziert werden [72].

Der Großteil der unter Phosphatmangel zwischen Wildtyp- und Deletionsstamm differentiell exprimierten Gene wird im  $\Delta$ CC3677-Stamm verstärkt exprimiert, was auf eine Rolle von CC3677 vor allem als Transkriptionsrepressor schließen lässt. Hier kann zwischen zwei verschiedenen Transkriptionsmustern unterschieden werden: Die erste Gruppe von Genen wird unter Phosphatmangel im Wildtyp reprimiert und im Deletionsstamm nicht mehr reguliert. Eine zweite Gruppe wird im Wildtyp nach Kultivierung in  $M2G^{-P}$ -Medium nicht reguliert oder induziert, im  $\Delta$ CC3677-Stamm aber induziert beziehungsweise nochmal um mindestens das Zweifache stärker exprimiert. Dabei zeigt sich, dass neben mehreren mit metabolischen Prozessen assoziierten Genen zum Beispiel die Gene für zwei regulatorische Proteine in Wildtyp-Zellen unter Phosphatmangel mit Hilfe von CC3677 reprimiert werden. Das Gen CC0051 codiert für einen Transkriptionsregulator der Cro/CI Familie mit Homologie zu MrpJ aus *Proteus mirabilis*, welches dort die Transkription des Flagellen-Regulons reprimieren kann und so die Flagellensynthese reduziert [111]. CC3159 codiert für ein Enzym, das Radikale bilden kann und an der posttranslationalen Modifikation von Proteinen zur Queuosin-Biosynthese beteiligt sein könnte. Queuosin ist ein modifiziertes Nukleosid bestimmter tRNAs (zum Beispiel für Histidin, Asparagin und Aspartat) an der Wobble-Position (dritte Base des Codons) und kann die Genauigkeit der Translation verbessern [74].



**Tabelle 3.1:** Durch CC3677 in M2G<sup>-P</sup>-Medium regulierte Gene. Die Gene sind nach COG-Klassifizierung geordnet und die Regulation als log<sub>2</sub>-Ratio zwischen der Genexpression in Wildtyp-Zellen und einem CC3677-Deletionsstamm angegeben. Die von CC3677 reprimierten Gene wurden je nach Expressionsmuster in zwei Gruppen eingeteilt: 1. durch CC3677 im Wildtyp reprimiert und 2. verminderte Induktion im Wildtyp unter Phosphatmangel im Vergleich zum ΔCC3677-Stamm.

Gen	log <sub>2</sub> Ratio	Produkt	Gruppe
Metabolismus-assoziert			
CC0583	-1,03	Succinylarginin-Dihydrolase	↓2
CC1091	-2,57	Amin-Oxidase	↓1
CC1118	1,44	Sirohäm-Synthase	↑
CC1849	-1,03	Coniferylaldehyd-Dehydrogenase	↓2
CC1969	-2,15	Glutamin-Synthetase	↓2
CC2006	-1,09	Glycosyl-Hydrolase	↓1
CC2544	-1,12	mutmaßliche Aminopeptidase	↓2
Motilität/ Chemotaxis/ Sekretion			
CC0174	-1,14	TypII Sekretionssystem Protein E	↓2
CC0175	-1,24	TypII Sekretionssystem Protein F	↓2
CC0177	-1,20	TypII Sekretionssystem Protein H	↓2
CC0178	-1,25	TypII Sekretionssystem Protein I	↓2
CC0181	-1,04	TypII Sekretionssystem Protein L	↓2
CC3040	-1,33	Flagellum-spezifische ATP-Synthase	↓1
CC3349	-1,56	Chemotaxis-Protein McpH	↓2
Transkription/ Signaltransduktion/ Posttranslationale Modifikation			
CC0051	-1,18	Transkriptionsregulator der Cro/CI Familie	↓1
CC2267	1,44	Stressantwort-assoziertes Protein der Dabb-Familie	↑
CC3159	-1,57	Queuosin-Biosynthese Protein QueE	↓1
Unbekannte Funktion			
CC0221	-1,42	hypothetisches Protein	↓2
CC0236	-1,05	hypothetisches Protein	↓1
CC0554	-1,05	hypothetisches Protein	↓2
CC2078	2,10	hypothetisches Protein	↑
CC2257	-1,04	Methyltransferase	↓2
CC2340	-1,01	hypothetisches Protein	↓1
CC3101	-1,17	hypothetisches Protein	↓1
CC3166	-1,02	hypothetisches Protein	↓1
CC3675	-3,00	hypothetisches Protein	↓2

Einige der unter Phosphatmangel induzierten Gene scheinen durch CC3677 reprimiert zu werden. Auffällig ist hier das verstärkte Vorkommen von Genen, die mit der Bewegung von Zellen oder Sekretion assoziiert sind. Die Bedeutung einer so bewirkten Feinabstimmung der Transkriptionsregulation für spezifische Gene muss aber noch geklärt werden.

### 3.2.4 Das Typ II-Sekretionssystem und damit assoziierte Gene aus *C. crescentus* werden unter Phosphatmangel induziert

Unter allen getesteten Bedingungen, bei denen die Zellen nicht ausreichend mit Phosphat versorgt waren (sei es Kultivierung der Zellen in M2G<sup>-P</sup>-Medium oder die Verwendung eines *pstS*-Deletionsstammes), konnte die Induktion der Gene CC0170 bis CC0183 beobachtet werden. Ein Großteil der codierten Proteine zeigt eine Homologie zu Proteinen des Typ II-Sekretionssystems (T<sub>II</sub>SS) in *Klebsiella oxytoca* und wurde als Bestandteil des GSP (*general secretion pathway*) annotiert. Diese Bezeichnung bezieht sich auf Sekretionssysteme, die Pro-

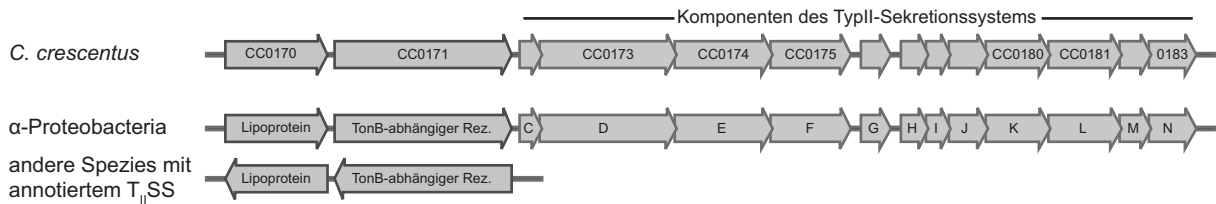
teine, welche über Sec- oder Tat-Transport in das Periplasma gelangt sind, über die äußere Membran aus der Zelle ausschleusen. Der Begriff genereller Sekretionsweg ist dabei irreführend, da verschiedene Sekretionssysteme auf einem vorherigen Transport der Proteine über das Sec- oder Tat-System beruhen, und soll hier nicht weiter verwendet werden (zur Begriffserklärung siehe [44]). Laut COG-Klassifizierung sind einige Mitglieder des T<sub>II</sub>SS in *C. crescentus* mit der Bewegung von Zellen assoziiert, während andere der Gruppe „Intrazellulärer Transport und Sekretion“ zugeordnet werden. Zur besseren Übersicht wurden die Gene CC0170 bis CC0183 in dieser Arbeit alle in der COG-Gruppe für Sekretion eingeordnet (siehe Tabelle 5.4 und 5.6 im Anhang).

Als Prototyp eines Typ II-Sekretionssystems gilt das Pul-System in *K. oxytoca*. Es besteht aus 15 Komponenten mit Homologie zu Bestandteilen des Typ IV-Pilus und ist in diesem Organismus für den Transport des Enzyms Pullulanase an die Oberfläche der Bakterienzelle verantwortlich [33]. Im Allgemeinen spielt das T<sub>II</sub>SS für die Pathogenität verschiedener Bakterienspezies eine wichtige Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass dieses System für den Transport hydrolytischer Enzyme wie Zellulase und Pectinase in pflanzenpathogenen Erregern sowie von Proteasen und Toxinen in tierpathogenen Organismen verantwortlich ist. Als ein sehr bekanntes Beispiel soll hier das Cholera-Toxin erwähnt sein [153]. In einigen Gram-negativen Bakterien werden zudem Oberflächenproteine (sogenannte S-Layer Proteine für *surface layer proteins*) über das Typ II-Sekretionssystem transportiert [149, 153]. Die Funktion des T<sub>II</sub>SS in *C. crescentus* konnte dagegen bisher noch nicht geklärt werden. So verläuft der Transport des vorherrschenden S-Layer Proteins RsaA zum Beispiel über das Typ I-Sekretionssystem [10].

Abbildung 3.27 zeigt eine schematische Darstellung der durch die Transkriptionsanalyse identifizierten Genregion CC0170 bis CC0183. Das Gen CC0170 codiert für ein konserviertes hypothetisches Protein mit keinen bekannten funktionellen Domänen, während CC0171 für einen TonB-abhängigen Rezeptor codiert. Vergleicht man die Struktur dieses Clusters in verschiedenen Vertretern der Klasse  $\alpha$ -Proteobacteria wird deutlich, dass mit den Genen für das Typ II-Sekretionssystem immer die Gene für einen TonB-abhängigen Rezeptor und einem zu CC0170 homologen Protein unbekannter Funktion (meist als Lipoprotein annotiert) assoziiert sind. In anderen Bakterien des Phylum Proteobacteria, die Homologe zum T<sub>II</sub>SS aufweisen (auch hier wieder meist annotiert als GSP-Proteine, siehe oben), scheint eine transkriptionelle Einheit aus den Genen für den TonB-abhängigen Rezeptor und dem zu CC0170 homologen Lipoprotein meist unabhängig vom Sekretionssystem auf dem Chromosom codiert zu sein.

Das Protein CC0170 ist circa 53 kDa groß und besitzt eine N-terminale Signalsequenz. Homologe Proteine in anderen Spezies sind oft als Lipoprotein oder mutmaßlich sekretiertes Protein annotiert. Mit Hilfe von Western Blot-Analysen unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen CC0170 konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass dieses Protein in *C. crescentus* nur von Zellen produziert wird, die in M2G<sup>-P</sup>-Medium und nicht in Komplexmedium kultiviert wurden (siehe Abbildung 3.28A). Zur Kontrolle, ob die Produktion von CC0170 von der Verfügbarkeit an Phosphat abhängt, wurden diese Experimente mit Proben des *pstS*-Deletionsstammes bei Anzucht in PYE-Komplexmedium wiederholt. Auch in diesen Zellen konnte das Protein CC0170 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Da in verschiedenen Bakterien eine gerichtete, zum Teil polare Lokalisation des Typ II-

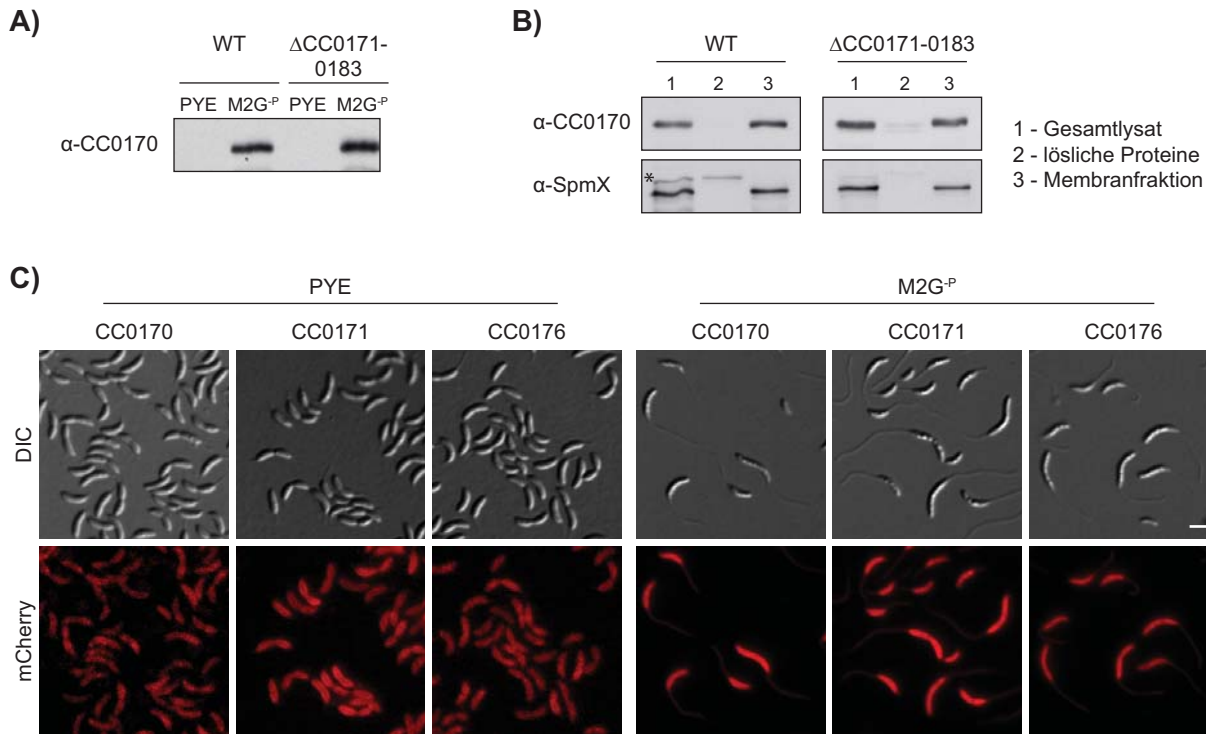


**Abbildung 3.27:** Schematische Darstellung der Genregion assoziiert mit CC0170 oder den entsprechenden homologen Genen. In *C. crescentus* und anderen Vertretern der Klasse  $\alpha$ -Proteobacteria liegen CC0170-Homologe zusammen mit den Genen für einen TonB-abhängigen Rezeptor und das Typ II-Sekretionssystem auf dem Chromosom. In anderen Proteobakterien bilden nur die Gene für das CC0170-Homolog und den TonB-abhängigen Rezeptor eine transkriptionelle Einheit.

Sekretionssystems beschrieben wurde [157, 25], sollten das zu PulG aus *K. oxytoca* homologe Protein CC0176 sowie der TonB-abhängige Rezeptor CC0171 und das Protein CC0170 in *C. crescentus* mit Hilfe von induzierbaren Fluoreszenzfusionen visualisiert werden. Für alle drei Proteine konnte nach Induktion eine weithin stochastische Verteilung in der Membran und keine spezifische Lokalisation zu definierten Bereichen der Zellhülle nachgewiesen werden, unabhängig davon ob die Zellen in PYE-Komplexmedium oder in M2G<sup>-P</sup>-Medium kultiviert wurden (Abbildung 3.28C).

Zu CC0170 homologe Proteine werden häufig als Lipoproteine vorhergesagt und auch das in *C. crescentus* beobachtete Fluoreszenzsignal lässt auf eine Assoziation mit der Membran schließen. Aus diesem Grund wurde die Sequenz des Proteins näher untersucht, wobei im N-Terminus für Lipoproteine charakteristische Bereiche identifiziert werden konnten. So besitzt CC0170 eine sogenannte n-Region (bestehend aus positiv geladenen Aminosäuren), eine h-Region (hydrophobe Aminosäuren) und eine c-Region (ein als Lipo-Box bezeichneter Bereich mit konserviertem Cystein) [11]. Im Einklang damit konnte in Wildtyp-*Caulobacter*-Zellen eine Membranassoziation von CC0170 mit Hilfe einer Fraktionierung gezeigt werden (Abbildung 3.28B). Dafür wurden Zellen des Wildtypstammes aufgeschlossen und Membranen und assoziierte Proteine durch Ultrazentrifugation von löslichen Proteinen getrennt. Die Proben wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und mittels Western Blot analysiert.

Um die Orientierung von CC0170 in der Membran näher charakterisieren zu können, wurden Stämme mit einer TEM-1  $\beta$ -Lactamase-Fusion des Proteins generiert. Da der Wildtyp-*Caulobacter*-Stamm CB15N eine natürliche Resistenz gegen Ampicillin und verwandte Antibiotika aufweist, wurde der  $\beta$ -Lactam sensitive Stamm CS606 ( $\Delta$ CC2137, [190]) verwendet und eine durch Xylose induzierbare Fusion von CC0170 an ein entsprechendes Enzym eingeführt ( $\Delta$ CC2137 *xylX::P<sub>xyl</sub>-CC0170-blaM*, JK368). Dabei ist die Orientierung des Fusionsproteins entscheidend, da die  $\beta$ -Lactamase nur eine Antibiotikaresistenz vermitteln kann, wenn sie im Periplasma vorhanden ist. Bei Kultivierung dieses Stammes auf PYE-Festmedium mit Zusatz von 0,3 % Glukose konnte aufgrund der ausbleibenden Induktion keine  $\beta$ -Lactamase gebildet werden und der Stamm war sensitiv gegenüber einer Behandlung mit Ampicillin. Bei Induktion durch Anzucht des Stammes auf Festmedium mit einem Zusatz von 0,3 % Xylose erfolgte die Produktion des Fusionsproteins, was zu einer Antibiotikaresistenz führte (siehe Abbildung 3.29A). Aufgrund dieses Experiments ist eine, zumindest temporäre, Orientierung des C-terminalen Bereichs von CC0170 in Richtung Periplasma anzunehmen.

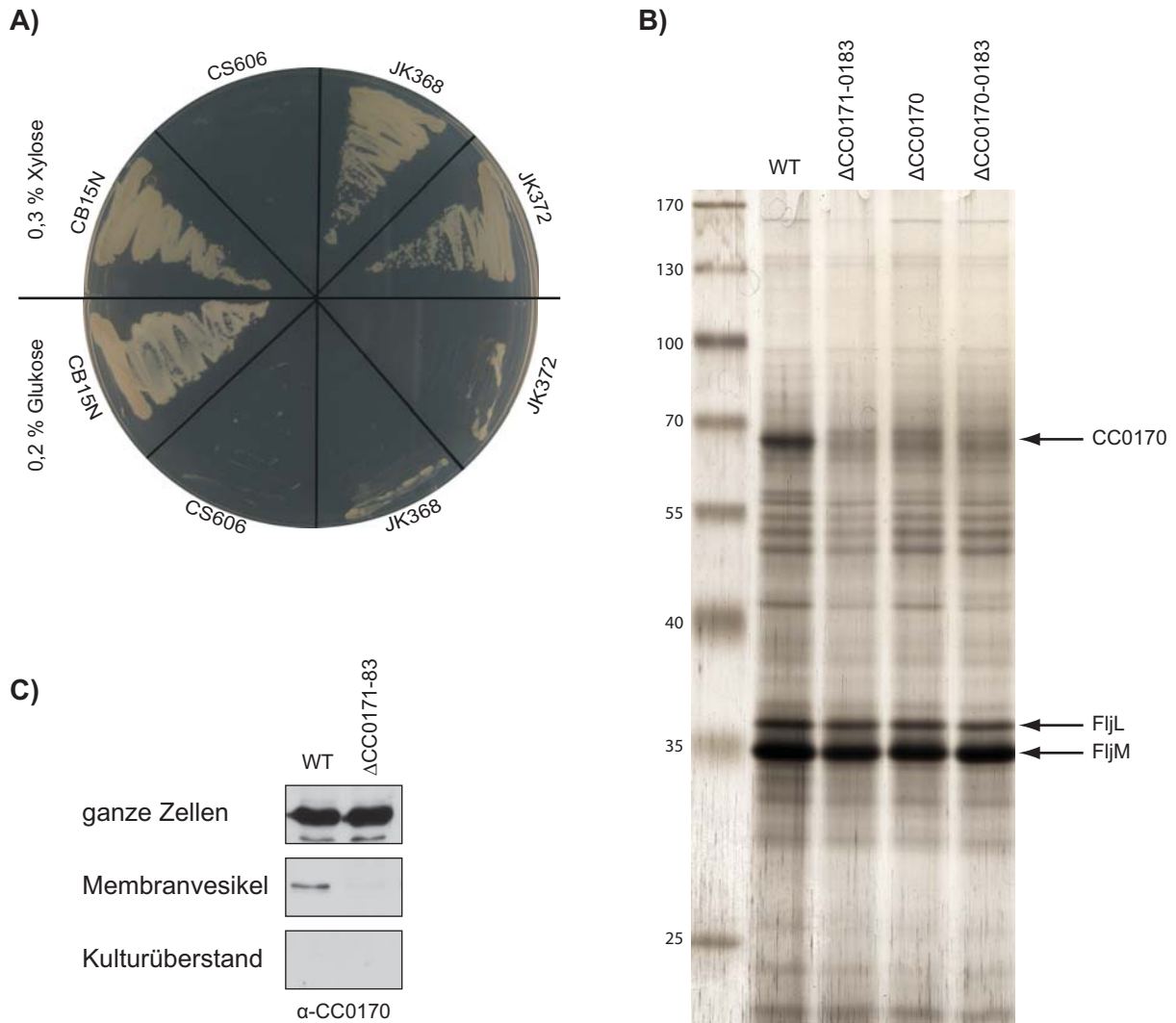


**Abbildung 3.28:** Charakterisierung des Genclusters CC0170-0183. **A)** Western Blot-Analyse zur Bestimmung der Proteinmenge von CC0170 in Zellen nach Kultivierung in verschiedenen Medien. Zellen der Stämme CB15N (Wildtyp) und JK362 ( $\Delta$ CC0171-0183) wurden in PYE-Komplexmedium oder M2G<sup>-P</sup>-Medium angezogen und die Proteinmenge qualitativ durch Immunblot mit spezifischen Antikörpern gegen CC0170 bestimmt. **B)** Membranassoziation von CC0170. Zellysate des Wildtypstammes CB15N oder des Stamms JK362 wurde mittels Ultrazentrifugation in eine lösliche und eine Membranfraktion geteilt. Die verschiedenen Fraktionen wurden mittels Western Blot unter Verwendung von Antikörpern gegen CC0170 oder SpmX untersucht. Das Membranprotein SpmX [140] dient als Kontrolle der erfolgten Trennung von löslichen und Membranproteinen. \*: unspezifische Banden. **C)** Lokalisation verschiedener Komponenten des Clusters. Subzelluläre Verteilung der Fusionsproteine in den Stämmen SW63 (*xylX::P<sub>xyl</sub>-CC0170-mCherry*), SW65 (*xylX::P<sub>xyl</sub>-CC0171-mCherry*) und JK364 (*xylX::P<sub>xyl</sub>-CC0176-mCherry*). Die Zellen wurden in PYE-Medium angezogen, und entweder direkt für 2 h mit 0,03 % Xylose induziert oder 1:20 in M2G<sup>-P</sup>-Medium mit Zusatz von 0,03 % Xylose überführt und für 24 h inkubiert. Die Stämme wurden darauf mittels DIC- und Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Balken: 2  $\mu$ m.

Da einige der zu CC0170 homologen Proteine mutmaßlich sekretiert werden, wurde in einem nächsten Schritt der Kulturüberstand von *C. crescentus*-Zellen in M2G<sup>-P</sup>-Medium untersucht. Dazu wurde der Wildtypstamm CB15N für 24 h in diesem Medium kultiviert und die Zellen sedimentiert. Um Zellreste zu entfernen wurde der Überstand filtriert und daraufhin ankonzentriert. Die so erhaltenen Proben wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen und die Proteine nach Auftrennung mittels Silberfärbung visualisiert (Abbildung 3.29B). Hier konnten mittels MALDI-MS-Analyse spezifischer Gelbanden neben Bestandteilen der während der Prozedur wahrscheinlich abgescherten Flagellen (die Flagelline FljM und FljL [53]) große Mengen an CC0170 im Überstand von Wildtyp-*Caulobacter*-Zellen nachgewiesen werden.

Bei der verwendeten Methode zur Ankonzentrierung des Überstandes werden lösliche und membrangebundene Proteine angereichert. Um eine Unterscheidung zu ermöglichen wurde versucht, Vesikel der äußeren Membran (sogenannte OMVs für *outer membrane vesicles*) aus *C. crescentus* zu isolieren. OMVs werden von verschiedenen Bakterienspezies abgegeben

um DNA zu Übertragen (Transfer von Antibiotikaresistenzen), Toxine oder antimikrobielle Substanzen zu transferieren oder die Kommunikation innerhalb der Spezies zu ermöglichen [99, 119]. Bisher ist in *C. crescentus* keine Abgabe von OMVs in größerem Maßstab beschrieben. Zur Isolation von OMVs wurde der Kulturüberstand filtriert und die darin enthalte-



**Abbildung 3.29:** Nähere Charakterisierung des Proteins CC0170. **A)**  $\beta$ -Lactamase-Assay zur Bestimmung der Ausrichtung von CC0170 in der Membran. Die Stämme CB15N (Wildtyp), CS606 ( $\Delta$ CC2137), JK368 ( $\Delta$ CC2137 *xytX::P<sub>xyt</sub>-CC0170-blaM*) und JK372 ( $\Delta$ CC2137  $\Delta$ CC0171-0183 *xytX::P<sub>xyt</sub>-CC0170-blaM*) wurden auf Festmedium mit Zusatz von 50  $\mu$ g/ml Ampicillin und entweder 0,3 % Xylose (oben) oder 0,2 % Glukose (unten) ausgestrichen und nach 48 h Inkubation auf Wachstum überprüft. **B)** Visualisierung der Proteine in Kulturüberstand. Nach Sedimentation der Zellen wurden die Überstände verschiedener Flüssigkulturen mittels Konzentratoren eingengt, die Proteine mit 10% Trichloressigsäure (TCA) gefällt und die Proben auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Proteine wurden mittels Silberfärbung detektiert und durch MALDI-MS-Analyse identifiziert (in Kooperation mit Jörg Kahnt). **C)** Isolation von Vesikeln der äußeren Membran aus Kulturüberstand. Aus dem nach Sedimentation der Stämme CB15N (Wildtyp) und JK362 ( $\Delta$ CC0171-0183) erhaltenen Kulturüberstand wurden mittels Ultrazentrifugation Membranvesikel isoliert. Proben der ganzen Zellen, der Vesikel und des Kulturüberstands vor der Ultrazentrifugation wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und mit Hilfe eines Western Blots mit Antikörpern gegen CC0170 analysiert.



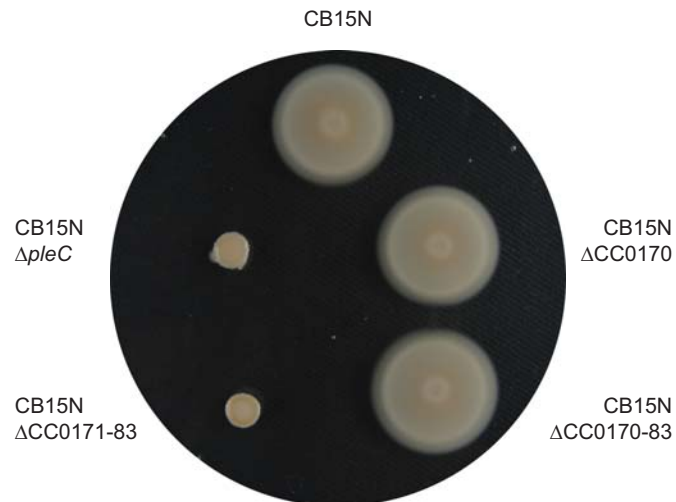
nen Membranen mittels Ultrazentrifugation sedimentiert. Die Proben wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen und die Proteine nach Auftrennung mittels Western Blot analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, CC0170 aus Kulturüberstand zu sedimentieren (Abbildung 3.29C), was auf ein Vorhandensein dieses Proteins in OMVs schließen lässt. Zum Vergleich: die Mengen an CC0170 im filtrierten Kulturüberstand waren so gering, dass ein Nachweis von CC0170 mittels Western Blot in diesen Proben, also ohne vorangegangene Anreicherung (sei es über das Ankonzentrieren aller Proteine oder über Sedimentation der Membranen) nicht möglich war.

Um nun die Funktion des Typ II-Sekretionssystems und der damit assoziierten Proteine in *C. crescentus* analysieren zu können, wurden verschiedene Deletionsstämme konstruiert. Die Deletion des gesamten Clusters ( $\Delta$ CC0170-0183; JK192), des Transportsystems einschließlich des TonB-abhängigen Rezeptors ( $\Delta$ CC0171-0183; JK362) oder allein von CC0170 (JK360) führte zu keinem morphologischen Defekt der Zellen. Auch die Wachstumsrate in PYE-Komplexmedium sowie die Vitalität und der Phänotyp der Zellen nach Kultivierung in M2G<sup>-P</sup>-Medium zeigten keine Besonderheiten (Daten nicht gezeigt). Dagegen war der Nachweis von CC0170 im Kulturüberstand dieser Stämme nicht möglich. Weder durch Ankonzentrierung aller Proteine, noch durch Sedimentation der Membranen konnte CC0170 im Überstand eines Stammes detektiert werden, der kein funktionelles T<sub>II</sub>SS besitzt (Abbildung 3.29B und C). Die Abgabe von OMVs scheint im Deletionsstamm des Transportsystems (JK362) dagegen nicht vermindert zu sein, da in der sedimentierten Fraktion Proteine der äußeren Membran nachweisbar waren (Daten nicht gezeigt). Außerdem unterscheidet sich die Menge an produziertem CC0170 in diesem Stamm nicht vom Wildtyp, was durch Western Blot-Analysen von Zelllysats, sowie der Membranfraktion dieses Stammes gezeigt werden konnte (siehe Abbildung 3.28A und B). Durch Einführen einer  $\beta$ -Lactamase-Fusion in den Stamm JK372 konnte zudem ausgeschlossen werden, dass die Lokalisation von CC0170 im Periplasma vom Vorhandensein des T<sub>II</sub>SS abhängt (Abbildung 3.29A).

Mit Hilfe der Proben des ankonzentrierten Überstandes wurde versucht, weitere Proteine zu identifizieren, die in Abhängigkeit vom Typ II-Sekretionssystem in den Kulturüberstand gelangen. Dafür wurde die Zusammensetzung des Überstandes von Wildtyp-Zellen mit Hilfe von MALDI-MS-Analysen mit der entsprechenden Probe des  $\Delta$ CC0170-0183-Stammes verglichen. Überraschenderweise konnten bis auf das Fehlen von CC0170 in der Probe des Deletionsstammes keine Unterschiede festgestellt werden.

Vor kurzem konnte eine Rolle des Typ II-Sekretionssystems für die Fortbewegung von *Legionella pneumophila*-Zellen auf Festmedium nachgewiesen werden [165]. Um einen Einfluss auf die Motilität von *C. crescentus*-Zellen zu testen, wurden der Wildtypstamm und die verschiedenen Deletionsstämme auf PYE-Schwärmpplatten aufgetropft und der Schwärmmradius nach zwei Tagen Inkubation verglichen (Abbildung 3.30). Zellen, in denen die Gene für das T<sub>II</sub>SS und den TonB-abhängigen Rezeptor deletiert wurden (Stamm JK362), zeigten einen starken Defekt der Motilität. Interessanterweise sind Zellen, in denen zusätzlich das Gen für CC0170 deletiert wurde, in der Lage, sich wie der Wildtyp auf Festmedium zu bewegen. Der Bewegungsdefekt des Stammes JK360 lies sich auch im Lichtmikroskop feststellen und ist nicht auf die Bewegung auf Oberflächen limitiert (Daten nicht gezeigt).





**Abbildung 3.30:** Bewegungsdefekt eines  $\Delta$ CC0170-0183-Stammes auf Festmedium. Kulturen der Stämme CB15N (Wildtyp), JK192 ( $\Delta$ CC0170-0183), JK360 ( $\Delta$ CC0170) und JK362 ( $\Delta$ CC0171-0183) wurden in PYE-Medium angezogen und bei einer  $OD_{600nm}$  von 0,5 auf PYE-Festmedium (0,3% Agar) mit Zusatz von 0,2% Glukose aufgetropft. Nach zwei Tagen Inkubation bei 28 °C wurden die Schwärme verglichen. Als Kontrolle wurde ein Stamm mit beschriebenem Bewegungsdefekt ( $\Delta$ pleC [3]) der Analyse zugefügt.

Um einen Einfluss des Typ II-Sekretionssystems auf die Biosynthese des Flagellums zu untersuchen, wurden Zellen der verschiedenen Stämme mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) gefärbt, da der Fluoreszenzfarbstoff mit dem Flagellin aus *C. crescentus* interagiert und so zur Markierung von Flagellen verwendet werden kann [102]. Mit Hilfe dieser Methode konnte nachgewiesen werden, dass in allen mittels Schwärmplatten untersuchten Stämmen ein polares Flagellum gebildet wird (Daten nicht gezeigt). Die Ursache des Bewegungsdefektes in einem Deletionsstamm des Typ II-Sekretionssystems bei Vorhandensein von CC0170 bleibt somit spekulativ.



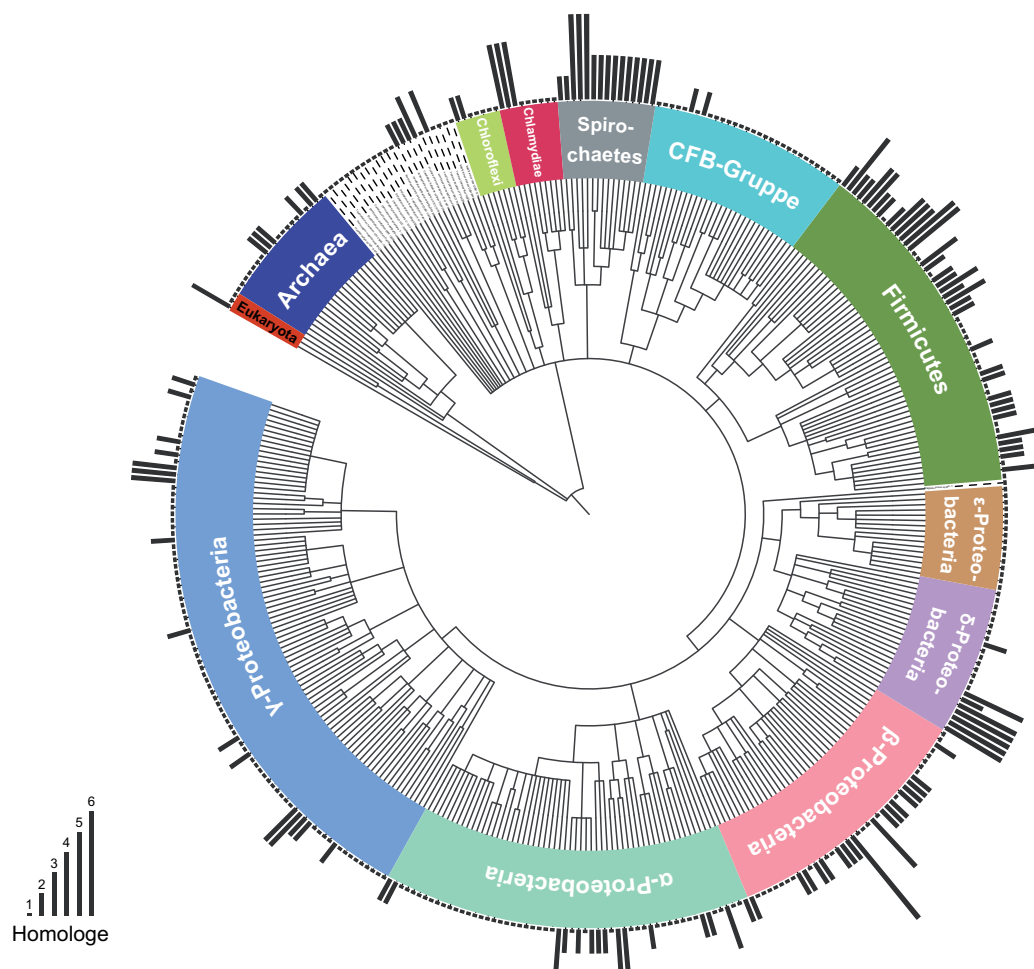
# 4 Diskussion

## 4.1 Bactofilin sind eine neue Gruppe von Zytoskelettelementen

In letzter Zeit wurden verschiedene Proteine in Bakterien identifiziert, die eine intrinsische oder Co-Faktor-abhängige Fähigkeit zur Polymerisation besitzen. Mit Ausnahme des Tubulin-Homologs FtsZ und des Aktin-Homologs MreB konnten die meisten dieser Proteine aber nur in einzelnen Bakterienspezies nachgewiesen werden [70, 132]. Die neben den Tubulin- und Aktin-Homologen dritte große Gruppe strukturbildender Proteine, die Intermediärfilament-artigen Proteine, sind bisher nur in wenigen Organismen nachgewiesen worden, wobei sich die Suche aufgrund der geringen Konservierung der Proteinsequenz als schwierig erweist [8, 13]. Bemerkenswert ist dabei, dass die in Bakterien gewonnenen Erkenntnisse eine auffällige Analogie zum Organisationsprinzip der Zytoskelettelemente in Eukaryoten aufweisen, wo die Nukleotid-bindenden Proteine Tubulin und Aktin eine hoch konservierte Proteinsequenz besitzen. Die eukaryotischen Intermediärfilamente (Laminin, Vimentin, Desmin, Keratin) dagegen verbindet eher die gemeinsame Architektur einer zentralen gestreckten Domäne, die eine Zusammenlagerung zu sogenannten *Coiled-Coils* ermöglicht. Der grundlegende Aufbau des Zytoskeletts ist somit bei Eukaryoten und Prokaryoten vergleichbar, wenn auch die Funktion der einzelnen Elemente stark voneinander abweichen kann.

In dieser Arbeit wurde mit den Bactofilinen eine neue Klasse von polymerbildenden Proteinen identifiziert, die eine weite Verbreitung besitzen. Bactofiline konnten vor allem in Bakterien nachgewiesen werden, homologe Proteine existieren aber auch in den anderen beiden Reichen (Abbildung 4.1). So konnten bisher in mehreren Spezies des Phylum Euryarchaeota sowie in einigen wenigen Pilzen Proteine mit DUF583-ähnlicher Sequenz identifiziert werden.

Die verschiedenen Bactofiline scheinen im Laufe der Evolution in Bakterien eine Vielzahl unterschiedlicher Lokalisationsmuster und damit wahrscheinlich auch unterschiedlicher Funktionen angenommen zu haben. Die charakteristische Domäne DUF583 könnte dabei als eine Art Modul für die Polymerisation funktionieren, wohingegen die spezifische Funktion des Proteins durch die flankierenden Regionen determiniert wird. In Übereinstimmung damit sind häufig repetitive Prolin-reiche Sequenzen am N- und C-Terminus der Proteine nachzuweisen, die Protein-Interaktionen vermitteln könnten [194]. Die Existenz von mehreren paralogen Proteinen in vielen Spezies lässt eine gewisse Redundanz in der Wirkung der Bactofiline vermuten. Wie schon für die Aktin-Homologe gezeigt wurde, können in Bakterien zeitgleich mehrere Paraloge eines Zytoskelettelements auftreten, die zu einer Superstruktur polymerisieren [29, 41]. Dabei kann das Vorhandensein verschiedener Untereinheiten möglicherweise die Zahl der Interaktionspartner erhöhen oder für regulatorische Zwecke genutzt werden.



**Abbildung 4.1:** Modell der Verteilung von Bactofilinen. Mit Hilfe der Pfam-Datenbank [58] wurden Bakterienspezies mit DUF583-enthaltenden Proteinen identifiziert (Daten abgerufen am 14.06.2010). Wenn Sequenzinformationen für mehrere Stämme einer Spezies vorhanden waren, wurde nur eine Sequenz für die weitere Analyse gewählt. Die zugehörigen Identifikationsdatei wurden über die Webseite des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) bezogen. Der phylogenetische Baum wurde mit Hilfe des iTOL Servers [110] generiert. Für jede Spezies wird die Anzahl an Bactofilin-Homologe durch die schwarzen Balken markiert.

### 4.1.1 Die Funktion der Bactofilin

Die zwei Bactofilin-Homologe aus *C. crescentus* wurden im Rahmen dieser Arbeit am ausführlichsten untersucht. BacA und BacB bilden Membran-assoziierte Cluster, die an der Rekrutierung der Peptidoglykansynthase PbpC zum bestellten Pol beteiligt sind (siehe Abbildung 4.2) und somit MreB und FtsZ bei der Positionierung von Zellwandbiosyntheseenzymen unterstützen [28]. Trotz allem bleibt die Rolle von PbpC unklar. Frühere Studien zeigten, dass die Verlängerung der Prostheka durch das Einfügen von neuem Zellwandmaterial in einer konischen Wachstumszone an der Basis des Stiels erfolgt [155, 1]. Somit könnte PbpC direkt am Wachstum des Fortsatzes beteiligt sein und dort die Aktivität anderer Zellwandsynthasen unterstützen, die abhängig von MreB und RodZ lokalisiert werden [6]. Alternativ könnte die Lokalisation von PbpC an die polaren Bactofilin-Cluster die Neuorganisation der Zellwand in der Nähe der Stielbasis vermitteln und sie so gegen mechanischen Stress sichern. Interessan-

terweise wurde schon früh angenommen, dass die Zusammensetzung des Peptidoglykans in der Prostheka eine andere als in der restlichen Hülle ist, was sich zum Beispiel durch eine verstärkte Resistenz des Stiels gegen Lysozym-Behandlung bemerkbar macht [136, 155]. So könnte PbpC die Festigkeit der Prostheka durch eine Veränderung in der Zusammensetzung oder Struktur des Peptidoglykan verstärken.

Die Ursache der durch ektopische Polymerisation der Bactofiline bedingten Zellformdefekte ist unklar. Eine Deletion von *pbpC* konnte den Effekt der BacA-Überproduktion nicht abschwächen (Daten nicht gezeigt), was zu der Vermutung führt, dass die Deformation der Zellen nicht durch eine Dysregulation der PbpC-Aktivität hervorgerufen wird. Da die heterologe Expression von *bacA* und *bacB* aus *C. crescentus* in *E. coli* ebenso zu Formveränderungen führt (siehe Abbildung 3.20), scheinen Bactofilin-Cluster die Zellwandbiosynthese indirekt stören zu können. So könnten die an der inneren Membran angelagerten Polymere die Zugänglichkeit bestimmter Regionen der Zellhülle für die durch FtsZ und MreB lokalisierten Multienzymkomplexe blockieren. Alternativ könnten Bactofiline eine mechanische Kraft auf die Zellhülle ausüben und somit zu einem veränderten Wachstum des Peptidoglykan-Sacculus führen. Ein solcher Mechanismus konnte kürzlich für Crescentin nachgewiesen werden [27] und scheint auch die Erklärung für das Auftreten von Zellformdefekten nach der Überproduktion einer mutierten Version des Zellteilungsproteins FtsA in *E. coli* zu sein [62]. Ebenso könnten aber auch bisher noch nicht identifizierte Interaktionspartner der Bactofiline in *E. coli* und *C. crescentus* an den Formveränderungen beteiligt sein. Da sich die terminalen Aminosäuresequenzen der Bactofiline dieser Organismen aber nicht ähneln, erscheint dies unwahrscheinlich. Es muss noch geklärt werden, ob das Potential der BacAB-Cluster, die Zellmorphologie zu modifizieren, einen Einfluss auf ihre Rolle unter natürlichen Bedingungen in *C. crescentus* ausübt.

Die Funktion der Bactofilin-Homologe in *M. xanthus*, *E. coli* und *S. oneidensis* wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht ausführlich analysiert. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Proteine MXAN4635-7 aus *M. xanthus* zu ausgedehnten filamentartigen Strukturen in der Zelle polymerisieren (siehe Abbildung 3.17), die an zuvor mittels Elektronenmikroskopie aufgelöste Filamentbündel erinnern [26]. Die drei Proteine sind in einem möglichen Operon codiert und werden sehr wahrscheinlich co-exprimiert [66]. Die identische Lokalisation und zeitgleiche Expression lässt auf eine Interaktion von MXAN4635-7 schließen, so dass diese Proteine möglicherweise wie BacAB Co-Polymere in der Zelle ausbilden. Des weiteren ist die Organisation von MXAN4635-7 auf dem Chromosom von Interesse, da die Gene direkt *downstream* von *sgmTS*, zwei Genen, die für die S-Motilität von Bedeutung sind [198], und *agmH*, einem in A-Motilität involvierten Gen [197], lokalisiert sind. Dem entsprechend konnte gezeigt werden, dass Zellen ohne MXAN4635-7 einen ausgeprägten Defekt der S-Motilität aufweisen (siehe Abbildung 3.19), was auf eine Rolle der Bactofiline für die Bewegung der Zellen hindeutet. Das vierte Paralog scheint dagegen keinen Einfluss auf die Beweglichkeit der Zelle auszuüben. MXAN7475 liegt auf dem Chromosom nahe von Genen, die für ParAB-Proteine codieren und somit für die Chromosomensegregation von Bedeutung sind. Da die Verteilung der DNA von einer Deletion des Gens aber nicht beeinflusst wird, kann zur Funktion von MXAN7475 keine endgültige Aussage getroffen werden. Möglicherweise dient das Protein als Lokalisationsfaktor oder ist an der Organisation der DNA in der Zelle beteiligt.

Interessant ist auch das Bactofilin-Homolog von *E. coli*. Ebenso wie die Proteine in *C. crescentus* scheint YbcA die Biegung von Zellen zu verstärken. Eine hohe Konzentration des Proteins in der Zelle führt zum Aufblähen und anschließenden Lyse der Bakterienzellen. Die Funktion dieses Proteins bleibt offen, da es auf dem F-Plasmid (Fertilitätsplasmid) codiert ist und so im untersuchten Laborstamm keine endogene Kopie enthalten war. Das Gen *ybcA* liegt in einem potentiellen Operon zusammen mit vier weiteren Genen, die für hypothetische Proteine codieren, so dass hier kein Hinweis auf eine mögliche Funktion zu finden ist. Viele der auf dem F-Plasmid codierten Proteine sind für den DNA-Transfer über Konjugation bedeutsam, der mit Hilfe einer Pilus-Struktur ermöglicht wird. Da die Ausbildung des Pilus mit einer Veränderung der Zellform einher geht (gesteuert vor allem durch die Genprodukte der *tra*-Region), könnte YbcA während dieser Differenzierung von Bedeutung sein. Beachtenswert ist, dass die Produktion von BacAB aus *C. crescentus* zu Zitronen-förmigen oder stark gebogenen Zellen führt (die Struktur der Zellpole also wahrscheinlich nicht verändert wird), während die ektopische Produktion von YbcA in *E. coli* schnell die Ausbildung Sphäroplasten-ähnlicher Zellen bewirkt, was für globalere Änderungen der Zellmorphologie spricht. Die unterschiedliche Wirkung der Proteine auf die Zellform könnte auf eine divergente Funktion in den Zellen hindeuten.

Wenn auch das Lokalisationsmuster von SO1662 in *S. oneidensis* auf eine Rolle für die Zellteilung hin deutet, führt die Deletion des Gens weder zu Wachstumsdefekten noch zu Änderungen der allgemeinen Zellmorphologie (Daten nicht gezeigt). Das Protein könnte trotz allem an der Stabilisierung des Zellteilungsapparats beteiligt oder als Lokalisationsfaktor für die Rekrutierung anderer Proteine von Bedeutung sein, ist aber für den korrekten Ablauf der Zellteilung nicht essentiell.

Übereinstimmend mit den vorgestellten Daten aus *C. crescentus* und *E. coli* wurde das Bactofilin-Homolog CcmA aus *Proteus mirabilis* mit der Aufrechterhaltung der Zellform in Zusammenhang gebracht [75]. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass eine Zerstörung des Gens durch eine Transposoninsertion zu einer verstärkten Zellkrümmung und daraus folgend zu einem Defekt im Schwärmverhalten der Zellen führt, wobei der zugrunde liegende Mechanismus aber nicht geklärt werden konnte.

Bei der Suche nach Faktoren, die in *Helicobacter pylori* an der Ausbildung der gewundenen (helikalen) Form beteiligt sind, konnte kürzlich neben mehreren Peptidoglykan-modifizierenden Enzymen ein weiteres DUF583-enhaltendes Protein identifiziert werden [168]. Das entsprechende Protein wurde mit einer Endopeptidase-Aktivität assoziiert, wobei in der Proteinsequenz keine dafür benötigten Motive nachweisbar sind. Ähnlich wie BacAB in *C. crescentus* könnte dieses Protein durch Interaktion mit Murein-modifizierenden Enzymen die Zellform beeinflussen.

Ferner konnte gezeigt werden, dass die Bactofilin-Homologe YhbE und YhbF aus *Bacillus subtilis* für die Motilität dieser Zellen erforderlich sind. Auch hier konnte jedoch die exakte Rolle der Bactofiline nicht bestimmt werden [142].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Proteine, die eine Domäne DUF583 besitzen, in Bakterien eine Vielzahl unterschiedlicher Lokalisationsmuster aufweisen und dabei möglicher-



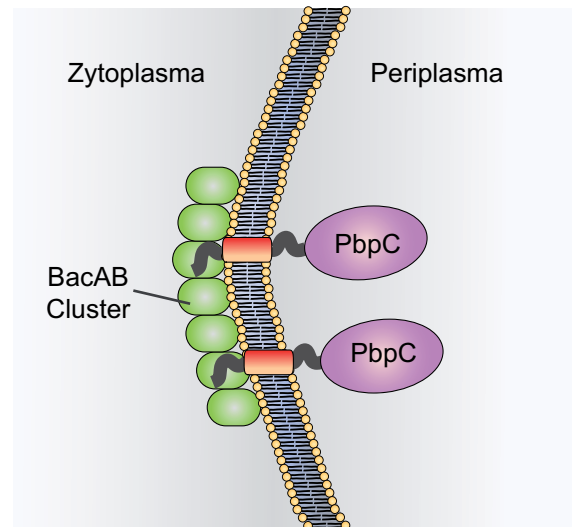
weise ein komplexes Repertoire an Funktionen ausüben. So konnte ein Einfluss der Bactofilin-Homologe auf die Morphogenese und Bewegung von Zellen demonstriert werden, die dabei entscheidenden Mechanismen müssen aber noch aufgedeckt werden.

### 4.1.2 Die Polymerisation von Bactofiline

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass BacA der Hauptbestandteil der Bactofilin-Cluster in *C. crescentus* ist. Mittels quantitativem Western Blot wurde die Kopienzahl auf ~200 Moleküle pro Zelle bestimmt, ein im Vergleich mit anderen Zytoskelettproteinen recht niedriger Wert [138]. Da Bactofilin-Cluster in *Caulobacter*-Zellen aber nicht die gesamte Zelle durchspannen, sondern nur in der Nähe der Stielbasis auftreten - einem Bereich der Zelle mit einem inneren Durchmesser von weniger als 50 nm - ist dieser Wert durchaus realistisch. Außerdem spricht die hohe Stabilität von Bactofilin-Filamenten *in vitro* dafür, dass der Großteil an synthetisierten BacA und BacB-Molekülen in der Zelle als Polymer vorliegt. Die Menge an Protein, die ausreichend für die Ausbildung einer funktionellen Zytoskelettstruktur ist, könnte so für Bactofiline viel geringer sein als für andere Zytoskelettelemente, die meist hochdynamisch sind und größere Bereiche der Zelle füllen.

Durch verstärkte Produktion einer der beiden Untereinheiten war es möglich, die polaren BacAB-Cluster zu ausgedehnten polymeren Blättern zu vergrößern und die Ultrastruktur dieser polymeren Strukturen mittels hochauflösender Kryoelektronenmikroskopie zu untersuchen (siehe Abbildung 3.7). Da die visualisierten Strukturen einen recht geringen Durchmesser besitzen, bestehen diese Blätter wahrscheinlich nur aus einer einzigen Schicht von Bactofilin-Protofilamenten. Des weiteren ist immer nur ein einziges 'Blatt' in der Nähe der Membran zu detektieren, so dass sich die durch BacAB gebildeten Strukturen klar von den zuvor in *C. crescentus* beschriebenen mehrschichtigen Bündeln in der inneren Biegung der Zellen abgrenzen lassen [24]. Passend zu den in der Zelle beobachteten Strukturen konnte gezeigt werden, dass BacA *in vitro* unter natürlichen Salzbedingungen zu kabelartigen Strukturen polymerisiert (Abbildung 3.9). Eine Anlagerung dieser Filamente an die Oberfläche einer Membran könnte zusätzliche laterale Interaktionen ermöglichen und so die Ausbildung größerer Strukturen erlauben. Die Kryoelektronentomogramme zeigen eine Distanz von 9 nm (Zentrum-zu-Zentrum) zwischen der inneren Membran und den BacAB-Polymeren, was einem Zwischenraum von 5 nm entspricht, wenn ein Durchmesser der Membran von 5 nm und der BacAB-Cluster von 3 nm angenommen wird. Die Ursache dieser großen Entfernung ist unklar. Es ist anzunehmen, dass die ungeordneten Regionen, welche die Domäne DUF583 in den Proteinen umgeben, als eine Art flexible Verbindung zwischen den Bactofilin-Polymeren und der Zellhülle fungieren können. Da sie in *C. crescentus* aus 29 bis 44 Resten bestehen, sollten sie in einer ausgestreckten Konformation diese Distanz überbrücken können. Außerdem sind in den terminalen Bereichen der Bactofilin-Homologe verstärkt basische Aminosäuren zu finden, die in der Lage wären, mit der negativ geladenen Phospholipidmembran zu interagieren. Der zytoplasmatische Anteil von PbpC wiederum ist mit einer Länge von 85 Aminosäuren ausreichend, um die BacAB-Polymere zu erreichen.

Wie schon erwähnt, könnte die charakteristische Domäne DUF583 als eine Art Modul für die Zusammenlagerung der Bactofilin-Monomere agieren, während die spezifische Funktion



**Abbildung 4.2:** Modell der Funktion von Bactofilinen in *C. crescentus*. Die Bactofilin-Untereinheiten interagieren möglicherweise mit einem gekrümmten Bereich der Zellmembran und rekrutieren die Peptidoglykansynthase PbpC.

der Proteine durch die flankierenden Regionen bestimmt wird. Die Produktion eines N- und C-terminal auf die Domäne DUF583 verkürzten Proteins BacA in *C. crescentus* lieferte leider keine weiteren Erkenntnisse, da das entsprechende Protein bei Expression des Gens vom *xylX*-Locus oder über ein replizierendes Plasmid nicht stabil zu sein scheint (Daten nicht gezeigt). Im Rahmen der Bachelorarbeit von Nicole Schnaß wurde nach funktionsdeterminierenden Aminosäuren in der Sequenz der Domäne DUF583 gesucht. Dafür wurden verschiedene konservierte unpolare Aminosäuren aus der Domäne in BacA zu Serin mutiert. Durch Lokalisationsstudien konnte gezeigt werden, dass ein BacA-Derivat mit einem Austausch L73S V75S nicht mehr in der Lage ist, polymere Strukturen innerhalb der Zelle auszubilden und bei Überproduktion die Zellform zu verändern. Dieses Ergebnis liefert einen ersten Beweis, dass die Domäne DUF583 für die Polymerisation der Bactofiline von Bedeutung ist.

Alle bisher *in vitro* analysierten Bactofilin-Homologe waren in der Lage, spontan und ohne den Zusatz von Co-Faktoren zu polymerisieren. BacA-Filamente waren resistent gegen den Einsatz von Chelatoren und konnten auch noch unter hohen Salzkonzentrationen Polymere ausbilden (Abbildung 3.9A-D). Des weiteren war mittels DIC-Lichtmikroskopie kein dynamischer Umbau der Proteine zu detektieren, was zu dem Schluss führt, dass der Austausch einzelner Untereinheiten unter diesen Bedingungen, wenn überhaupt, sehr langsam vonstatten geht. Dies bestätigen auch erste *in vivo* Ergebnisse. Mit Hilfe von FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*) Analysen konnte gezeigt werden, dass nach dem Bleichen des Fluoreszenzsignals am Pol von Zellen, die Fusionen von *bacA* oder *bacB* an *venus* unter einem Xylose-induzierbaren Promotor exprimieren, im Verlauf von 30 Minuten kein Signal (BacB) oder nur eine sehr schwache Fluoreszenz (BacA) an den Zellpol zurückkehrt (Daten nicht gezeigt). Vergleichbare Resultate konnten für das Intermediärfilament-ähnliche Protein Crescentin erzielt werden [32], was diese Klasse von Proteinen klar von dynamisch organisierten Strukturen - wie sie von MreB und FtsZ gebildet werden - abgrenzt.

Die Zusammenlagerung von BacA und BacB in der Zelle ist ein zeitlich kontrollierter Prozess, wenn auch die zugrunde liegenden Mechanismen dieser Regulation noch aufgeklärt

werden müssen. Die Bactofiline besitzen zwar die intrinsische Fähigkeit zur Ausbildung polymerer Strukturen, aber die Menge der Proteine in der Zelle erreicht möglicherweise nicht den für die spontane Polymerisation nötigen Grenzwert von 250 nM (für BacA, siehe Abbildung 3.9E) und ermöglicht so eine zeitliche Kontrolle des Zusammenbaus durch die Zellzyklus-abhängige Akkumulation eines Nukleationsfaktors. Alternativ könnte es in Schwärmerzellen einen Mechanismus zur aktiven Repression der Polymerisation geben, der erst nach der Differenzierung der Zellen zu Stielzellen gelöst wird.

Ebenso wie ein möglicher Regulationsmechanismus der Polymerisation ist auch die Ursache für die Lokalisation von BacAB zum Pol noch unklar. In *C. crescentus* sind nur wenige Proteine mit einer ähnlichen Verteilung beschrieben, die als Lokalisationsfaktor für BacAB in Frage kommen. Die Histidinkinase DivJ [191] und der dazugehörige Lokalisationsfaktor SpmX [140] wären geeignete Kandidaten, die Lokalisation von BacAB scheint aber nicht beeinflusst durch die Deletion der entsprechenden Gene (Daten nicht gezeigt). Andererseits könnte auch die Biegung der Membran als Lokalisationsfaktor für die Bactofiline in Frage kommen. Dies konnte erst kürzlich für eukaryotische Proteine mit einer BAR-Domäne [61] und für DivIVA aus *B. subtilis* [107, 143] gezeigt werden. Die Ausbildung der Prostheka während des Schwärmer-zu-Stielzellen-Übergangs beinhaltet die Umformung der Zellhülle, was zu einer positiven Biegung im Bereich der Stielbasis führt. Bei der Annahme, dass die BacAB-Protofilamente eine konvexe Form mit ähnlicher Biegung aufweisen, sollte der Zusammenbau zu größeren Strukturen bevorzugt in dieser Region stattfinden (Abbildung 4.2). Wenn BacA oder BacB in größeren Mengen in der Zelle vorliegen, könnte sich diese Struktur dann ausgehend vom Pol entlang der konkaven Seite der Zelle in Richtung Mitte ausbreiten. Im Vergleich zu den BAR-Domänen enthaltenen Proteinen [61] könnten die Bactofiline dann in der Lage sein, die eigene Biegung durch Interaktion mit der Membran zu verstärken. So würde der Zug auf die Zellhülle erhöht und eine stärkere Biegung der ganzen Zelle hervorgerufen, was zu den Ergebnissen der Überproduktion in *C. crescentus*-Zellen passt (siehe Abbildung 3.5 und 3.8).

Analog zu den Bactofilinen aus *C. crescentus* zeigen die homologen Proteine in *M. xanthus* eine dynamische Lokalisation in der Zelle. Die aus MXAN4635-7 gebildete Struktur ist immer entlang der Längsachse der Zelle im Bereich der Zellmitte zu finden, was einen Mechanismus zur Regulation von Ausdehnung und Position der Polymere, ebenso wie deren Teilung während der Zytokinese nötig macht.

Die Veränderung der Lokalisation von SO1662 in *S. oneidensis* von einer diffusen Verteilung in der Zelle zur Akkumulation in der Zellmitte ist ebenfalls strikt mit dem Zellzyklus koordiniert. Eine Möglichkeit der Regulation wäre hier durch Formierung eines Faktors zur Rekrutierung von SO1662 in Abhängigkeit der Ausbildung des Divisoms gegeben, wie es schon für verschiedene Komponenten des Zellteilungsapparates gezeigt werden konnte [42].

Insgesamt teilen die Bactofiline viele charakteristische Eigenschaften mit den Intermediärfilamenten, wie einen eher langsamen Umbau und die Fähigkeit der Polymerisation in einer Nukleotid-unabhängigen Art und Weise [79]. Diese Ähnlichkeit könnte auf eine konvergente Evolution aufgrund des Bedarfs an Proteinen, die stabile Gerüste ausbilden können, hindeuten.

## 4.2 Transkriptionsregulation als Antwort auf eine Verknappung von Nährstoffen

Bakterien, die wie *C. crescentus* auf ein Leben in oligotrophen Frischwasserhabitaten spezialisiert sind, weisen eine Anpassung an Umweltbedingungen auf, bei denen die Konzentrationen kritischer Nährstoffe (Kohlenstoff, Stickstoff, Phosphor, Schwefel) im nano- bis mikromolaren Bereich liegen. Auf eine Veränderung in der Verfügbarkeit dieser Elemente muss schnell und adäquat reagiert werden. Dafür verwenden Bakterien unterschiedliche Strategien [176]: Zum einen kommt es zu einer verstärkten Transkription von Genen oder der Aktivierung der entsprechenden Enzyme, die für eine Nutzung alternativer Nährstoffquellen von Bedeutung sind (adaptive Antwort). Eine solche Reaktion dient der Umstellung des Metabolismus auf die veränderte Situation und erfolgt spezifisch für die jeweiligen Nährstoffe. Auf der anderen Seite findet eine Änderung des Wachstumsverhalten der Zellen statt. Ein Wechsel in einen für die stationäre Wachstumsphase charakteristischen Modus erhöht die Resistenz des Organismus gegenüber unterschiedlichen Stressbedingungen und steigert die Fähigkeit, lange „Hungerperioden“ zu überstehen. Diese Überlebensantwort (*survival response*) beinhaltet die Expression von Genen der allgemeinen Stressantwort mit Hilfe von alternativen Sigmafaktoren sowie die Drosselung der Proteinbiosynthese (stringente Kontrolle).

Eine aktuelle Studie legt nahe, dass eine Verknappung der essentiellen Elemente Kohlenstoff und Stickstoff bei oligotrophen Bakterien eine weniger stark ausgeprägte Änderung der Transkriptionsregulation im Vergleich zu Bakterien mit hohem Nährstoffbedarf wie *E. coli* und *B. subtilis* hervorruft [54]. So wird zum Beispiel in den gegenübergestellten Organismen die Aufnahme von Kohlenstoff- oder Stickstoffquellen verstärkt. Aber während in *C. crescentus* als einem Vertreter aus nährstoffarmen Umgebungen nur einzelne Gene für spezifische Transporter induziert werden, kann in *E. coli* die erhöhte Expression einer Vielzahl von Transportsystemen nachgewiesen werden, so dass ein breites Spektrum an Substanzen aufgenommen werden kann, die als potentielle Nährstoffquelle in Frage kommen [85]. Es stellt sich also die Frage, inwiefern die Ergebnisse von Untersuchungen an Bakterien, die an ein Überleben in polytrophen Umgebung adaptiert sind, auf Organismen aus anderen Habitaten übertragen werden können.

Die Reaktion von Bakterien auf einen Mangel an Phosphat wurde bisher ebenfalls vor allem in *E. coli* intensiv untersucht [145, 34, 176, 12]. Durch die in dieser Arbeit vorgestellten Microarray-Analysen wurde dagegen die Antwort in dem an nährstoffarme Umgebungen angepassten Bakterium *C. crescentus* näher charakterisiert. Mit Hilfe einer Deletionsmutante, die das phosphatbindende Protein PstS nicht mehr bilden kann und somit kein anorganisches Phosphat in die Zellen transportiert, konnte ein Phosphatmangel auch bei Kultivierung der Zellen in Komplexmedium simuliert werden. Dieser Stamm zeigte, ähnlich wie der Wildtyp nach Überführen in ein phosphatfreies Medium, ein verlangsamtes Wachstum. Dies lässt auf eine Veränderung des Wachstumsmodus als Teil der Überlebensantwort schließen, ein Ergebnis, welches sich auch mit den Transkriptionsdaten deckt (verminderte Expression von Genen assoziiert mit Proteinbiosynthese, siehe Abbildung 3.22). Die bei Stickstoffmangel beschriebene Verlängerung der Schwärmerzellphase [54] war dagegen unter Phosphatmangel nicht zu

beobachten. Aufgrund der schon beschriebenen morphologischen Veränderungen der Stielzellen [155] könnte man hier mit einer besseren Adaption dieses Zelltyps an die Notwendigkeit der verstärkten Phosphataufnahme argumentieren [186]. So könnte unter Phosphatmangel eine Verlängerung der Stielzellphase von Vorteil sein.

Die Veränderungen der Zell- und Stiellänge von *Caulobacter* Zellen bei einer Verknappung an Phosphat wurde zusätzlich als Mittel zur Suche nach Zellform-determinierenden Faktoren verwendet. Im Fokus stand hier die Verlängerung der Prostheka, welche sich leicht mit mikroskopischen Methoden nachweisen lässt. So konnte mittels Microarray-Analysen gezeigt werden, dass *bacA* bei Phosphatlimitierung verstärkt transkribiert wird. Die erhöhte Expression bestätigt die Vermutung, dass dieses Zytoskelettelement eine Rolle für die Etablierung des verlängerten Zellfortsatzes besitzt. Da bei Deletion von *bacA* ebenso wie bei einer Deletion des Gens für den Transkriptionsregulator PhoB (siehe unten) die Länge des Stiels unter Phosphatmangel reduziert ist, nicht aber die Länge des Zellkörpers (Abbildung 3.24), scheint BacA die gezielte Verlängerung der Prostheka unter diesen Bedingungen maßgeblich zu beeinflussen.

### 4.2.1 Steuerung der Antwort auf Phosphatmangel durch PhoB und CC3677

Zusätzlich zu einer allgemeinen Reaktion auf eine Verknappung an Nährstoffen und dem daraus folgenden Energiedefizit, werden in *C. crescentus*-Zellen auch Gene spezifisch als Antwort auf das Fehlen von Phosphat induziert (adaptive Antwort). Analog zu den bei Untersuchungen an *E. coli* bisher erhaltenen Daten [187, 12], scheint die Genexpression in *C. crescentus* unter Phosphatmangel vor allem durch den Transkriptionsregulator PhoB gesteuert zu werden und in erster Linie Systeme zur Aufnahme von Phosphat einzuschließen. Abhängig von PhoB werden in beiden Organismen die Gene für das PstSCAB-Transportsystem induziert, welches für die spezifische Aufnahme von anorganischem Phosphat ( $P_i$ ) verantwortlich ist (siehe Abschnitt 1.2.2). Des weiteren wird in *E. coli* unter Phosphatmangel ein ABC-Transportsystem zur Aufnahme von Glycelol-3-Phosphat (UgpBAEC) verstärkt exprimiert. Die zugehörigen Proteine zeigen eine Sequenzähnlichkeit zu einem Spermidin/ Putrescin-Transportsystem in *C. crescentus* (CC3134-37) welches ebenfalls bei Kultivierung ohne Phosphatquelle induziert wird, für das aber keine Abhängigkeit von PhoB gezeigt werden konnte. Neben Genen, die für Transporter codieren, wird in *E. coli* auch die Transkription von *phoA* über den Regulator PhoB veranlasst. Dieses Gen codiert für eine alkalische Phosphatase (Bap), die bei Phosphatlimitierung im Periplasma akkumuliert und aufgrund des Fehlens einer Selektivität für Monoester,  $P_i$  aus den verschiedensten Quellen freisetzen kann [173]. Zwar gibt es kein exaktes Abbild dieses Enzyms in *C. crescentus*, im Verlauf der hier vorgestellten Studie konnte aber die PhoB-abhängige Induktion unterschiedlicher Phosphatasen nachgewiesen werden. Mehrere dieser Enzyme tragen eine Signalsequenz und könnten so die Funktion von Bap im Periplasma übernehmen. Des weiteren konnte in *B. subtilis* die verstärkte Produktion der Phosphodiesterase GlpQ demonstriert werden [7, 5]. Dieses Enzym zeigt eine Homologie zu dem in *C. crescentus* in Abhängigkeit von PhoB verstärkt exprimierten CC3272 und wird ebenfalls sekretiert.



Neben den erwähnten Gemeinsamkeiten sind aber auch deutliche Unterschiede in der Transkriptionsregulation zwischen *E. coli*/ *B. subtilis* und *C. crescentus* zu beobachten, die möglicherweise dem stark verschiedenen Nährstoffbedarf der Organismen Rechnung tragen. Interessanterweise werden in *C. crescentus* zum Beispiel die Mitglieder des Phn-Regulon, welche in *E. coli* für die Aufnahme von Phosphonaten genutzt und in Abhängigkeit von PhoB induziert werden, unter Phosphatmangel nicht reguliert. In *Caulobacter* konnten bisher auch keine Proteine nachgewiesen werden, welche eine Pore in der äußeren Membran bilden und so die Aufnahme von phosphathaltigen Substanzen in das Periplasma erleichtern könnten. Diese Aufgabe übernimmt in *E. coli* das vor allem in  $\gamma$ -Proteobakterien konservierte Protein PhoE, welches ebenfalls Teil des Pho-Regulon ist. Ebenso scheint es in *C. crescentus* kein zweites, niedrig-affines Aufnahmesystem für  $P_i$  analog zum Pit-System zu geben. Dieses System bietet Bakterien wie *E. coli*, *B. subtilis* und *S. typhimurium* eine zusätzliche Möglichkeit der Phosphataufnahme, wird aber konstitutiv exprimiert und nicht über PhoB reguliert.

Die hohe Anzahl an TonB-abhängigen Rezeptoren im Genom von Bakterien, die in oligotrophen Habitaten zu finden sind, lässt auf eine potentielle Rolle dieser Proteine bei der Nährstoffaufnahme schließen. Bisher konnten TonB-abhängige Rezeptoren mit dem Transport von Vitamin B<sub>12</sub>, Siderophoren, Maltodextrinen und *N*-Acetylglucosamin-haltigen Oligosacchariden über die äußere Membran in Verbindung gebracht werden [96, 115, 51]. Von den zehn unter Phosphatmangel induzierten TonB-abhängigen Rezeptoren scheinen mindestens drei über PhoB reguliert zu sein und könnten die Aufnahme von bestimmten organischen Phosphatverbindungen fördern. Die Induktion von verschiedenen TonB-abhängigen Rezeptoren in *C. crescentus* scheint dabei eine Anpassung an das nährstoffarme Milieu, in dem dieser Organismus siedelt, zu sein und konnte schon für eine Änderung unterschiedlicher Bedingungen wie Limitierung von Kohlenstoff, Stickstoff oder Eisen oder den Zusatz von Schwermetallen gezeigt werden [83, 54, 38, 84].

Das Pho-Regulon in *C. crescentus* unterscheidet sich in den Grundzügen nicht von der schon in *E. coli* beschriebenen Antwort auf geringe Phosphatmengen. In beiden Organismen werden Gene induziert, die für Enzyme zur Freisetzung anorganischen Phosphats aus verschiedenen Nährstoffquellen oder für Transportsysteme zur verstärkten Aufnahme von Phosphaten codieren. Ferner werden Gene für Regulatoren der Transkription oder Signaltransduktion verstärkt exprimiert, was eine weitere Anpassung der Reaktion auf Nährstofflimitierung ermöglicht. Ebenso wird in beiden Organismen unter Phosphatmangel der Transkriptionsregulator PhoB induziert.

Mit Hilfe der Microarray-Analysen konnte in *C. crescentus* die Induktion eines MarR-ähnlichen Regulators (CC3677) unter Phosphatmangel nachgewiesen werden. Diese Klasse von Transkriptionsfaktoren kontrolliert die Expression von Genen in Antwort auf verschiedene Umweltsignale [193] und eine Beteiligung eines solchen Proteins an der Antwort auf Phosphatmangel ist denkbar. Tatsächlich konnte in *Serratia* 39006 die Induktion des MarR-ähnlichen Regulators Rap über PhoB demonstriert werden [71]. Während die bisher beschriebenen MarR-ähnlichen Proteine vor allem in pathogenen Organismen zu finden sind und dort die Expression von Virulenzfaktoren kontrollieren, könnte diese Familie von Transkriptionsfaktoren in Bakterien, die wie *C. crescentus* oligotrophe Nischen besiedeln, an der Anpassung



an Veränderungen der Lebensbedingungen beteiligt sein. Die exakte Rolle des induzierten Regulators in *C. crescentus* muss noch geklärt werden, er scheint aber durch Induktion von Genen für eine allgemeine Stressantwort oder als Antwort auf einen Stickstoffmangel sowie durch Repression eines Transkriptionsregulators, der möglicherweise die Flagellensynthese beeinträchtigen kann, die Überlebensantwort der Zelle (siehe oben) zu modulieren. Mehrere der unter Phosphatmangel deutlich induzierten Gene zeigen in einem CC3677-Deletionsstamm eine verstärkte Expression, was eine Repression dieser Gene im Wildtypstamm durch den Transkriptionsregulator bedeuten könnte. Ob eine solche Feinabstimmung tatsächlich auftritt oder die erhaltenen Daten auf die fehlende Induktion eines weiteren Regulators im Deletionsstamm zurückzuführen ist, bedarf weiterer Untersuchungen.

### 4.2.2 Die Funktion von Typ II-Sekretionssystemen

Durch einen Mangel an Phosphat werden in *C. crescentus* die Gene für das Typ II-Sekretionssystem (T<sub>II</sub>SS) verstärkt exprimiert. Dieses Transportsystem ist weit verbreitet unter Proteobakterien und dient dem Ausschleußen von Proteinen aus dem Inneren der Zelle über die äußere Membran in das umgebende Milieu [35].

In verschiedenen pathogenen Bakterien wird die Sekretion zum einen durch kontrollierte Transkription der zu transportierenden Substrate, aber auch durch die Regulation der Expression von Genen des T<sub>II</sub>SS gesteuert. So werden die Gene für das entsprechende Transportsystem in *Pseudomonas aeruginosa* oder *Erwinia carotovora* in Abhängigkeit von der Wachstumsphase induziert, ein Vorgang der über Quorum sensing reguliert wird [31, 113]. In *Vibrio cholerae* wird zudem eine vom umgebenden Milieu abhängige Regulation der Sekretion vermutet. So finden die Toxinproduktion und der zugehörige Transport wahrscheinlich erst dann statt, wenn die Bakterien das intestinale Epithelium erreichen [106]. Für andere Prokaryoten wäre ein ähnlicher Regulationsmechanismus denkbar, da zum Beispiel die Sekretion hydrolytischer Enzyme erst dann sinnvoll erscheint, wenn ihre Wirkung dem Organismus einen Überlebensvorteil bietet. Eine Kopplung der Produktion von Proteinen zur Freisetzung von anorganischem Phosphat mit dem verstärkten Transport dieser Enzyme in die nähere Umgebung von *C. crescentus*-Zellen bei Kultivierung unter Phosphatmangel wäre somit eine logische Konsequenz.

Ein interessantes Merkmal des Sekretionssystems ist die Fähigkeit zum Transport gefalteter und augenscheinlich nicht verwandter Proteine. Die Primärstruktur bisher identifizierter Substrate zeigt keine Homologie und es können sowohl Monomere (zum Beispiel das Enzym Elastase), als auch Oligomere (wie das Cholera-Toxin) transportiert werden. Ein Vergleich der bisher beschriebenen Typ II-Sekretionssysteme verdeutlicht zudem, dass die Anzahl der transportierten Proteine von eins (in *Klebsiella oxytoca*) bis >25 (in *Legionella pneumophila*) variieren kann [35, 40]. Als ein allen Substraten immanentes Charakteristikum wurde die Häufung von  $\beta$ -Faltblättern in der Sekundärstruktur diskutiert. Auch das eigentliche Sekretionssignal konnte bisher nicht identifiziert werden. Aufgrund des Transports gefalteter Proteine erscheint jedoch ein strukturelles Merkmal wahrscheinlicher als eine spezifische Aminosäuresequenz [152].

Welche Proteine durch das T<sub>II</sub>SS in *C. crescentus* transportiert werden ist noch unklar. Viele

nicht-pathogene Organismen sekretieren Proteine wie Zellulase und andere abbauende Enzyme, die ihnen eine Anpassung an vorherrschende Umweltbedingungen ermöglichen. So könnte *C. crescentus* bei einem Mangel an anorganischem Phosphat Enzyme ausschleusen, die an der Freisetzung von  $P_i$  aus organischen Polymeren beteiligt sind. Dieses Szenario wäre auch in Übereinstimmung mit der in den Microarray-Analysen sichtbaren, verstärkten Expression von Genen für unspezifische Phosphatasen und Nukleasen. Die Zahl möglicher Phosphatquellen in einer natürlichen Umgebung ist kaum einzugrenzen, und eine erste Untersuchung mit häufig vorkommenden Verbindungen (Phytat und Polyphosphat) konnte noch keine Beteiligung des Typ II-Sekretionssystems aufzeigen. Zwar konnte belegt werden, dass Wildtyp-*C. crescentus*-Zellen beide Verbindungen als alleinige Phosphatquelle nutzen können (Abbildung 3.23), ein Deletionsstamm mit fehlendem Transportsystem zeigt aber ein vergleichbares Verhalten (Daten nicht gezeigt). Weitere Versuche mit organischen Verbindungen, die als potentielle Phosphatquelle in Betracht gezogen werden können, stellen eine viel versprechende Methode zur Identifikation der transportierten Substrate dar.

Das Protein CC0170 wird in *C. crescentus* zusammen mit einem TonB-abhängigen Rezeptor direkt *upstream* des Typ II-Sekretionssystems codiert. Das potentielle Lipoprotein wird nur unter Phosphatmangel exprimiert, besitzt einen hohen Anteil an  $\beta$ -Faltblattstrukturen (siehe oben) und stellt so ein weiteres mögliches Substrat für das Transportsystem dar. In der Tat konnte im Verlauf dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Nachweis von CC0170 im Kulturüberstand der Zellen vom Vorhandensein des Transportsystems abhängt. Analog dazu konnte ein Transport von Lipoproteinen über das T<sub>II</sub>SS schon in anderen Organismen gezeigt werden. So wird das Lipid-gebundene Enzym Pullulanase aus *Klebsiella pneumoniae* erst auf die Außenseite der Zelle transportiert und später spezifisch in das Medium abgegeben [43]. In diesem System ist der Transport des Proteins über die innere Membran sowie die Modifikation (Acylierung) nicht vom Typ II-Sekretionssystem abhängig, dagegen aber die Lokalisation in der äußeren Membran. Auch in den hier vorgestellten Versuchen konnte der Transport des Proteins in das Periplasma und die Assoziation von CC0170 mit der Membran in einem vom T<sub>II</sub>SS unabhängigen Prozess nachgewiesen werden. Ob das Protein über das Sekretionssystem spezifisch in die äußere Membran integriert wird, muss noch geklärt werden.

Die Aufgabe von CC0170 in der Zelle bleibt weiterhin ein Rätsel. Homologe Proteine sind in vielen Vertretern des Phylums Proteobacteria mit annotiertem Typ II-Sekretionssystem konserviert, wobei  $\gamma$ -Proteobakterien das Transportsystem, aber kein CC0170-Homolog besitzen. Aufgrund des Fehlens konservierter funktioneller Domänen in der Proteinsequenz von CC0170 kann über die Funktion nur spekuliert werden. Eine verstärkte Produktion von CC0170 wurde mit einer erhöhten Phosphatase-Aktivität in Verbindung gebracht (Jean-Yves Matroule, nicht publiziert), eine Einschränkung der Enzymaktivität im Deletionsstamm ( $\Delta$ CC0170-0183) konnte aber im Verlauf dieser Arbeit weder in Komplexmedium, noch in M2G<sup>-P</sup>-Medium festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Möglich dagegen wäre eine Funktion von CC0170, die der der Bestandteile S (PulS oder OutS) des T<sub>II</sub>SS ähnelt. Diese Komponenten sind Lipoproteine, die möglicherweise als Chaperone fungieren und an der Verankerung von PulD in der äußeren Membran und der Stabilisierung der gebildeten Pore beteiligt sind [152]. Da diese Proteine bisher nur in  $\gamma$ -Proteobakterien nachgewiesen wurden, könnten CC0170-Homologe diese Funktion in anderen Bakterien übernehmen.

Analog zu den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen konnte in *B. subtilis* im Überstand von Kulturen, die unter Phosphatmangel kultiviert wurden, ebenfalls ein Lipoprotein nachgewiesen werden [7]. Das entsprechende Protein (YdhF) weist keine bekannten funktionellen Domänen auf und seine Rolle für die Zelle oder der Mechanismus der Sekretion wurden bisher noch nicht charakterisiert.

Der Bewegungsdefekt eines Deletionsstammes für das Typ II-Sekretionssystem könnte ein weiterer spannender Ansatzpunkt für die Funktion des Transportsystems sein. In *L. pneumophila* konnte das Fehlen des Sekretionssystems mit einer stark verminderten Bewegung der Zellen auf Oberflächen assoziiert werden [165]. Die in dieser Studie beschriebene Art der Motilität ist nicht abhängig von Flagellen oder Pili, sondern scheint im Zusammenhang mit der Sekretion einer Surfactant-ähnlichen Substanz zu stehen. Ob die spezifische Sekretion dieser Substanz oder der Transport eines aktivierenden Enzyms durch das T<sub>II</sub>SS gesteuert wird, konnte nicht geklärt werden. In ersten Experimenten konnte auch in *C. crescentus* ein Fehlen der Flagelle als Ursache des Bewegungsdefekts ausgeschlossen werden. Da die Bewegung auf Agar-haltigen Oberflächen in diesem Organismus aber allein durch einen Defekt der Flagellenfunktion gehemmt werden kann [89] und die Produktion eines Schleim- oder Surfactant-ähnlichen Stoffes noch nicht beschrieben wurde, erscheint ein zu dem in *L. pneumophila* beschriebenen System analoger Mechanismus unwahrscheinlich. Interessanterweise lässt sich der Bewegungsdefekt durch gleichzeitige Deletion von CC0170 aufheben. Dies könnte ein erster Hinweis sein, dass die verminderte Motilität der Zellen nicht die Folge einer ungenügenden Sekretion bestimmter Substanzen ist, sondern eher ein sekundärer Effekt durch Akkumulation von CC0170 im Periplasma. Dabei könnte das Protein zum Beispiel durch Blockade von Interaktionsdomänen zu Motorproteinen die Flagellenfunktion indirekt beeinträchtigen.

Abschließend sollte noch erwähnt werden, dass in einigen Organismen entweder einzelne Gene für das Typ II-Sekretionssystem fehlen oder zwar alle nötigen Gene identifiziert werden konnten, durch Basenaustausche, Insertionen oder Deletionen aber die Ausprägung eines funktionellen Transportsystems fragwürdig ist. So ist in *Burkholderia mallei* zwar das komplette System im Genom codiert, es konnte aber keine Sekretionsaktivität nachgewiesen werden. Dies wird mit einem *frame shift* in der Komponente J erklärt [127]. Auch wenn durch die Induktion des Genclusters CC0170 bis CC0183 unter Phosphatmangel ein Hinweis auf die Bedeutung des Typ II-Sekretionssystems in *C. crescentus* gegeben ist, kann die Möglichkeit eines nicht funktionellen Sekretionssystems zur Zeit noch nicht ausgeschlossen werden.

### 4.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Form einer Zelle zu bestimmen oder den aktuellen Bedürfnissen anzupassen, ist essentiell für das Überleben von Organismen, sei es nun eine einzelne Bakterienzelle oder die Gesamtheit von Zellen im Gewebe eines höheren Eukaryoten. Grundlage für die Morphologie bildet dabei das sogenannte Zytoskelett. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neue Klasse von Zytoskelettelementen identifiziert und charakterisiert. Ähnlich der Intermediärfilamente sind diese Proteine in der Lage, sich spontan zu polymeren Strukturen zusammenzulagern, die aufgrund der langsamen Umbaurate stabile Gerüste in der Zelle ausbilden können. Das Protein BacA scheint in *C. crescentus* maßgeblich an der unter Phosphatmangel beobachteten Verlängerung der Prostheka beteiligt zu sein. Diese Funktion wird durch Rekrutierung einer Peptidoglykansynthase zum bestielten Pol erreicht, kann aber nicht allein damit erklärt werden. In anderen Bakterienspezies konnten erste Hinweise für weitere Funktionen der Bactofiline gefunden werden, auch hier sind zusätzliche Analysen wie zum Beispiel die Suche nach Interaktionspartnern nötig, um die Funktion dieser Proteine zu entschlüsseln. Die nähere Untersuchung des Polymerisationsverhaltens von Bactofilinen könnte das Verständnis für die Bedeutung dieser Proteine fördern. Dabei konnte in einem ersten Schritt ein BacA-Derivat erstellt werden, welches durch Mutation zweier Aminosäuren in der Domäne DUF583 keine polymeren Strukturen mehr ausbilden kann. Dieses Ergebnis legt die Schlussfolgerung nahe, dass die Fähigkeit zum Aufbau gerüstartiger Konstruktionen in der Zelle durch diese Domäne bedingt ist. Wodurch die Polymerisation in den unterschiedlichen Zellen kontrolliert wird, verbleibt noch zu beantworten.

Durch Microarray-Analysen wurde die Antwort von *Caulobacter*-Zellen auf eine Limitierung des essentiellen Elements Phosphor näher erforscht. Diese Untersuchung konnte viele Gemeinsamkeiten zur gut charakterisierten Reaktion in *E. coli* aufdecken und potentielle Mitglieder des Pho-Regulon in *C. crescentus* identifizieren. Zusätzlich wurde die Induktion des bisher noch nicht beschriebenen TypII-Sekretionssystems in diesem Organismus unter Phosphatmangel nachgewiesen. Diese Entdeckung steht im Einklang mit der verstärkten Expression von Genen zur Freisetzung von Phosphat aus organischen Verbindungen, die aufgrund ihrer Größe nicht direkt in die Zelle aufgenommen werden können. So wäre durch den Transport der entsprechenden Enzyme an die Zelloberfläche eine Möglichkeit zur Akquisition von Phosphat aus sonst nicht zugänglichen Quellen gegeben. Ein derartiger Mechanismus muss noch experimentell bestätigt werden. Auch die Rolle des mit dem TypII-Sekretionssystem assoziierten, mutmaßlichen Lipoproteins CC0170 bleibt weiter unklar. Eine Funktion als Chaperon wäre denkbar, bleibt aber noch zu untersuchen.







# 5 Appendix

## 5.1 Auflistung der verwendeten Oligonukleotide, Plasmide und Stämme

**Tabelle 5.1:** Verwendete Oligonukleotide

Name	Beschreibung	Sequenz
Allgemeine Oligonukleotide zur Sequenzierung oder für die Kolonie-PCR		
eGYC-down		GCCCGACAACCACTACCTGAGCACCC
eGYC-up		CTTGCCGTAGGTGGCATCGCCCTCG
IntSpec-1		ATGCCGTTTGTGATGGCTTCCATGTCG
IntXyl-2		TCTTCCGGCAGGAATTCACTCACGCC
M13for		GCCAGGGTTTTCCCAGTCACGA
M13rev		GAGCGGATAACAATTTTCACACAGG
mCherry-down		GGCGCCTACAACGTCAACATCAAGTTGG
mCherry-up		CTCGCCCTCGCCCTCGATCTCGAAC
omega-ter		CGGTTTACAAGCATAAAGCTTGCTCAATC
pBAD24-rev		ACCGCTTCTGCGTTCTGATTTAATC
pBAD24-uni		CCTACCTGACGCTTTTTATCGCAAC
pET-for		CACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATC
pPR9TT-for		AACTGCCAGGCATCAAATTAAGCAG
pPR9TT-rev		GTTGTAAAACGACGGGATCCCC
Pvan-for		TGGACTCTAGCCGACCGACTGAGACGC
Pxyl-1		CCCACATGTTAGCGCTACCAAGTGC
REV-uni		GGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTG
T7 rev		GCTAGTTATTGCTCAGCGG
Spezifische in dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide		
KL7	HAfor AgeI	CCGGTACCCATACGACGTCCCAGACTACGCTGG
KL8	HArev BsrGI	GTACCCAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTA
MT628	CC3277-uni	TAGGATCCATGAACGACTGGACGCTGCCGCCCT
MT629	CC3277-rev	TTTTGCTAGCCTAGTAGGGCAGGTTGTCCGGGGGCG
MT693	CC3277-seq	CTATTTCCGGCGCGGGCACCTATGG
MT743	CC1873 for	TATATATACATATGTTTCAGCAAGCAAGCTAAATCGAACAACAAG
MT851	EcYuaD-for	TATACATATGAGGGCTTACTGCCCTCATTATC
MT852	EcYuaD-rev	TAGAGCTCCACTTTCTCTCGCTTTTACTAACTCAGACACATTG
JK9	LB phoB for	ATAAAGCTTCGGCGACGAGCGCCTGGACACCCTG
JK10	LB phoB rev	ATGGATCCGTCTTCTGTCTTCGACCACCAAAACG
JK11	RB phoB for	ATGGATCCTCGGCGGGCTACTCGCTGGACATGG
JK12	RB phoB rev	ATGAATTTCGCTGGAGGCCTTGGTCGCCAGCCTG
JK13	CC1873 rev	ATCCCGGGTTAGCCGGCGCTCTTGCGGATCGCC
JK15	CC3022 rev	ATCCCGGGTTAGTGCGCCGAGTGGTTATAGGGC
JK18	CC1873 for PciI	ATATATACATGTTTCAGCAAGCAAGCTAAATCGAACAACAAG
JK19	CC3022 for PciI	ATATATACATGTTTCGCCAAGAAGAAAGAGACCCCC
JK22	phoB for	ATATCATATGACTCCCTACGTTTTGGTGGTCAAGACGAAG
JK23	phoB rev	ATATAGCTAGCTCAGGCCGCATCCATGTCCAGCGAG
JK24	pho Promotor for	ATACTCGAGGAACATCTGCCGCTCTGACCGAAC

Fortsetzung auf nächster Seite

**Tabelle 5.1:** Fortsetzung: Verwendete Oligonukleotide

Name	Beschreibung	Sequenz
JK25	pho Promotor rev	ATACTGCAGATCAGCGCCAGGACGATAAGCGAAAG
JK26	pstS LB for	ATGAATTCGGGGTGACCGAGTTCAAAAAGCCCAAG
JK27	pstS LB rev	ATATGGATCCAGCGACGGTGGCGACCGCGCC
JK28	pstS RB for	ATATGGATCCAACGCCCTGACGCCGATGCCG
JK29	pstS RB rev	ATAAAGCTTCCTCAGGTCGCCGACGACGCGG
JK31	CC3022 lang for NdeI	AATTAACATATGAGCAGCCTGAAGCTTCCCGCCG
JK32	CC3022 lang for BspHI	ATATATTCATGAGCAGCCTGAAGCTTCCCGCCGA
JK34	pstS for	ATATACATATGAACAAGCTCATCGGCGCGGTCCGC
JK35	pstS rev kurz	TATATCCCGGGCCAGATACAGCTGCTCGAGCTTGAA
JK36	pstS rev kurz AfII	ATATCTTAAGGCTCGAGCTTGAAGTTGAAGTCCGGG
JK37	pstS rev NheI	ATATATGCTAGCCTAGTTCTTCGGCGCCGCGCATCGGC
JK38	pstS seq 1	GATCAAGATCGGCTTCGACGGCATCGTCGTC
JK39	pstS seq 2	CCTCGAAGAGAACGGCTCGCGCATCAAAGG
JK40	SO1662 LB for	ATATACGCGTAACATAAGATAATTTTCAAAGGTGATGGCGGC
JK41	SO1662 LB rev	ATATGGATCCGCTCAGAGTGGGGGACGATTTGCG
JK42	SO1662 RB for	ATGGATCCGCTTTGATATCGCAGAGTCAAGAAAATAAC
JK43	SO1662 RB rev	ATCTGCAGGCTAATTTTGGGGGCTGATACATTTAAGGC
JK44	SO1662 for KpnI	ATATGGTACCAGGAGGAAAAGTTCTTGTTTACCCGCAAATCGTCCC
JK45	SO1662 rev PstI	TATCTGCAGGTTAGTTTTCTTGACTCTGCGATATCAAGAC
JK46	phoPromotor seq	CATGATGTGTTTGACAATGGCCAGCCCCAA
JK47	phoPromotor for HindIII	ATATAAGCTTCCGAACGCTTCTATCGGGTCAAGGTCAG
JK48	CC0170-0183LBfor	ATATACTAGTGGTGTGCGCCGGCGACACGATCCGC
JK49	CC0170-0183LBrev	ATATCTGCAGGCAGCTCATGAGGATTAGGTTTCTATACAGCTTC
JK50	CC0170-0183RBfor	ATATCTGCAGCGCCGACCGGTCCGCCGGTCG
JK51	CC0170-0183RBrev	ATATGAATTCGATCGCCCTCTGGAGCGTTCTGGCC
JK52	CC0183 for	CGCCCCATGAGCCATCGCCTTCTCCTGG
JK57	CC0754-0757LBfor	ATATACTAGTGGGCAGGACGGCGTCGAGCGAGTAG
JK58	CC0754-0757LBrev	ATATCTGCAGCGCGGCGATCCGTCAGGCGGTAC
JK59	CC0754-0757RBfor	ATATCTGCAGAAGACGGTCCGTCGTCAGCCCGCG
JK60	CC0754-0757RBrev	ATATGAATTCGACGCCCCCTGGTCCACGTGGTGG
JK61	CC0757 seq	CGTGTCCGCGGTGGTCCACAAGAACC
JK62	CC0996 LB for	ATATACTAGTCCGCTGGCTGGGCGGCTTCGGGAC
JK63	CC0996 LB rev	ATATCTGCAGCCGCGCCTGCGCGGGCTCGG
JK64	CC0996 RB for	ATATCTGCAGTCAGGCGCGCATGAGCGCTGCTC
JK65	CC0996 RB rev	ATATGAATTCCTCGATCTGCAATCGGCCCGGGCGG
JK66	CC1373 LB for	ATATACTAGTCTGTTCTGAATGGCGTCCGCACCCCTGC
JK67	CC1373 LB rev	ATATCTGCAGCATGGTGATCTTGTTCGCATGGATCTGGGTC
JK68	CC1373 RB for	ATATCTGCAGGGGCTGGAAGGTTTCGTTACGCGG
JK69	CC1373 RB rev	ATATGAATTCCTCGGATTGACCAGCTGGAAGTGAAGGATC
JK70	CC2225 LB for	ATATACTAGTGACGCCCTTCGAAAGCGAAGACGACCAC
JK71	CC2225 LB rev	ATATGGATCCCCGGCTGGTCCGACGACGCG
JK72	CC2225 RB for	ATATGGATCCACGCTCAGGAACCGAGCCCTTCAACC
JK73	CC2225 RB rev	ATATGAATTCGAGCTTTGTTACCGTTATCCCGGCGACC
JK74	CC3094 LB for	ATATACTAGTCCACCGCCACCGAGTACGGCACG
JK75	CC3094 LB rev	ATATCTGCAGCGTACGGGCGAGGGGTCGCG
JK76	CC3094 RB for	ATATCTGCAGCTCCAGGAAAGACACGGTGTCCCGC
JK77	CC3094 RB rev	ATATGAATTCGCCCAGGGCTTTGCGCTCTATCGCG
JK78	CC3329-3330LBfor	ATATACTAGTCCGCGAGCGAACCCGGCGTGGGCG
JK79	CC3329-3330LBrev	ATATCTGCAGTGGGCGTGGTCCGTCCTGAGGCTG
JK80	CC3329-3330RBfor	ATATCTGCAGGATCGGTTGGAAGATGCGCATCGGGTCG
JK81	CC3329-3330RBrev	ATATGAATTCGGCGGGCTGTCTGAGCCTCGTGACC
JK82	CC3677 LB for	ATATACTAGTGATCAGCATCCGGTCGCTCGAGGCC
JK83	CC3677 LB rev	ATATCTGCAGCCCCAAGAAGGACAAGGCCGCCAAGAAG
JK84	CC3677 RB for	ATATCTGCAGACCTGCGCCAGCTTGTGCGCCCTTG
JK85	CC3677 RB rev	ATATGAATTCACCAAGGACTTCCAGAAGGCGACCTGGG
JK86	CC0996 for	ATATCATATGGGCGGCGTCGCCTCCGAGCC
JK87	CC0996 rev	ATATGAATTCATTCATAGCTTGCATGAGCAGCGCTCATGCG
JK88	CC1373 for	ATATCATATGAAGACCCAGATCCATGCGAACAAGATCACC
JK89	CC1373 rev	ATATGAATTCATTTATTCGGAGACCCGCGTGAACGAACCTTC

Fortsetzung auf nächster Seite

**Tabelle 5.1:** Fortsetzung: Verwendete Oligonukleotide

Name	Beschreibung	Sequenz
JK90	CC2225 for	ATATCATATGCGGAAGCGGTTGAAGGGCTCGGTTCC
JK91	CC2225 rev	ATATGAATTTCATCTAGTCCGGCTTCCGCGCGCTGC
JK92	CC3094 for	ATATCATATGTTTACCCCTGCGGGACACCGTGTCTTTC
JK93	CC3094 rev	ATATGAATTTCATTACGCGGCTTGGCCGCGCGAC
JK94	CC3329 for	ATATCATATGCGACCTCTGGTCGAGTGCGCGTC
JK95	CC3329 rev	ATATGAATTTCATTATCCGAGCGACAGCCTCAGGACG
JK96	CC3330 for	ATATCATATGGAGACCGACCCGATGCGCATCTTCC
JK97	CC3330 rev	ATATGAATTTCATCTAGGCCGCTTCCGCGCGGTCAC
JK98	CC3094 seq1	GCACCGACTCGGTGATCTCCAGCTC
JK99	CC3094 seq2	GACGCTGGCCCCGATGACGACATG
JK100	CC3094 seq3	GCAGGATGGCCATGCCGCCGTC
JK101	CC0996 for	ATATGGTACCGTGGGCGGGCTCGCCTCCGAGCC
JK102	CC1373 for	ATATGGTACCGTGAAGACCCAGATCCATGCGAACAAGATCACC
JK103	CC2225 for	ATATGGTACCATGCGGAAGCGGTTGAAGGGCTCGGTTCC
JK104	CC3094 for	ATATGGTACCATGTTTACCCCTGCGGGACACCGTGTCTTTC
JK105	CC3329 for	ATATGGTACCGTGGAGACCTCTGGTCGAGTGCGCGTC
JK106	CC3330 for	ATATGGTACCGTGGAGACCGACCCGATGCGCATCTTCC
JK110	CC0996 rev	ATATGAATTCTTTAGCTTGCATGAGCAGCGCTCATGCGC
JK111	CC1373 rev	ATATGAATTCTTTTCGGAGACCCGCGTGAACGAACCTTCC
JK112	CC2225 rev	ATATGAATTCTTGTCCGGCTTCCGCGCGCTGCTG
JK113	CC3094 rev	ATATGAATTCTTTCGCGGCTTGGCCGCGCGACC
JK114	CC3329 rev	ATATGAATTCTTTCCGAGCGACAGCCTCAGGACGG
JK115	CC3330 rev	ATATGAATTCTTGGCCGGTTCGCGCGGTCACG
JK116	CC1873 DUF for	ATATCATATGGTCGCCTCGCTGCTGTGACGCCG
JK117	CC1873 DUF rev	ATATGAATTCAACGCCGGGCGCTGGAACCTTCAGG
JK118	CC1873 DUF-S rev	ATATGAATTCCCTACGCCGGGCGCTGGAACCTTCAG
JK119	CC3277-2 for KpnI	ATATGGTACCTTCCGCGCCGACCTCAAGCACGCTGC
JK120	ybcA for-2	ATATCATATGTCTAAAGGAAAAATAAAGGAAAGTGATTC
JK121	ybcA rev-2	ATATGAATTCAAACCTTTCTCTCGCTTTTACTAACTCAG
JK122	ybcA rev-3	ATATGAATTCTTAACTTTCTCTCGCTTTTACTAACTC
JK126	CC3277 for NdeI	ATATCATATGAACGACTGGACGCTGCCGCC
JK127	CC3277 rev EcoRI	ATATGAATTCTTGTAGGGCAGGTTGTCCGGGGG
JK141	CC1873 V75S	CTCGGGCGAAACCGGCCATGTCGAGG
JK142	CC1873 L73S	GTCGAGCGACCCACGCGGACGTCG
JK159	CC0170 RB for	ATATCTGCAGACCAGCACCGCCTGCACGTCGCTG
JK160	CC0170 RB rev	ATATGAATTTCGCCGGGGAAGTTGGCGGAATAGCTCTTCTG
JK161	CC0171-0183LBfor	ATATACTAGTCACGATGATCCAGCGTCAGGTGAGCAGC
JK162	CC0171-0183LBrev	ATATCTGCAGCAGCAGGGACGTTAGCCGACGCGTAATC
JK169	CC3022 opt for NdeI	ATATCATATGTTTGCAAAGAAAAAAGAAACCCCGGCAAACTG
JK170	CC3022 opt rev EcoRI	ATATGAATTTCGAGTGCGCGCTATGATTATACGGGG
JK173	CC0176 NdeI for	ATATCATATGTCGACCGCAAACGCTGAAACGAAAC
JK174	CC0176 EcoRI rev	ATATGAATTCTCGCTCCAGTTGCCAATGTCCG
JK175	CC0179 NdeI for	ATATCATATGAAGGGTTTACCCCTGATCGAG
JK176	CC0179 EcoRI rev	ATATGAATTCTCTCGGCCCTCTCCCG
JK185	CC0170s for PshAI	ATATGACGCGGGTCCATGGGAACGGGGCGG
JK186	CC0170 rev EcoRI	ATATGAATTCTCAGTTGGTCGGCAGCGACGTGCAGG
JK187	CC0181 for NdeI	ATATCATATGGACCCCCGAAGAATGACCTTGCTC
JK188	CC0181 rev EcoRI	ATATGAATTCTGTGGCTTTCTCCTGATGATGAGATCG
JK189	CC0182 for NdeI	ATATCATATGAACGACGACTTGAGGCCGCC
JK190	CC0182 rev EcoRI	ATATGAATTCTGTGGGGCGGCGCGCGCG

**Tabelle 5.2:** Verwendete Plasmide. Abkürzungen DA: Diplomarbeit, BA: Bachelorarbeit.

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pBAD24	Plasmid zur Expression von Genen in <i>E. coli</i> unter Kontrolle von P <sub>BAD</sub> , Amp <sup>R</sup>	[73]
pBAD24CB	pBAD24 mit NdeI-Schnittstelle <i>up-stream</i> der RBS und verlängertem Polylinker	[122]
pBXMCS-2	Plasmid zur Expression von Genen in <i>C. crescentus</i> unter Kontrolle von P <sub>xyl</sub> , Kan <sup>R</sup>	[170]
pBXMCS-6	Plasmid zur Expression von Genen in <i>C. crescentus</i> unter Kontrolle von P <sub>xyl</sub> , Cam <sup>R</sup>	[170]
pET21a(+)	Plasmid zur Überproduktion von 6xHis-markierten Proteinen in <i>E. coli</i> , Amp <sup>R</sup>	Novagen
pET28a(+)	Plasmid zur Überproduktion von 6xHis-markierten Proteinen in <i>E. coli</i> , Amp <sup>R</sup>	Novagen
pJP5603	Integrationsplasmid für <i>S. oneidensis</i> , Kan <sup>R</sup>	[131]
pKO1Km	<i>galK</i> -enthaltender Suizid-Vektor für doppelt-homologe Rekombination in <i>M. xanthus</i> , Kan <sup>R</sup>	[175]
pNPTS138	<i>sacB</i> -enthaltender Suizid-Vektor für doppelt-homologe Rekombination in <i>C. crescentus</i> , Kan <sup>R</sup>	M.R.K. Alley, nicht publiziert
pNPTS138 R6KT	<i>sacB</i> -enthaltender Suizid-Vektor für doppelt-homologe Rekombination in <i>S. oneidensis</i> , Kan <sup>R</sup>	[104]
pPR9TT	Reporterplasmid zur Fusion von <i>lacZ</i> an das 3'-Ende einer Sequenz, Cam <sup>R</sup>	[154]
pVVENN-4	Integrationsplasmid zur Fusion von <i>venus</i> an das 5'-Ende eines Gens unter Kontrolle von P <sub>van</sub> , Gent <sup>R</sup>	[170]
pXblaMC-2	Integrationsplasmid zur Fusion von <i>blaM</i> an das 3'-Ende eines Gens unter Kontrolle von P <sub>xyl</sub> , Kan <sup>R</sup>	S. Schlimpert
pXCHYC-1	Integrationsplasmid zur Fusion von <i>mCherry</i> an das 3'-Ende eines Gens unter Kontrolle von P <sub>xyl</sub> , Strep/Spec <sup>R</sup>	[170]
pXCHYC-2	Integrationsplasmid zur Fusion von <i>mCherry</i> an das 3'-Ende eines Gens unter Kontrolle von P <sub>xyl</sub> , Kan <sup>R</sup>	[170]
pXCFPC-2	Integrationsplasmid zur Fusion von <i>ecfp</i> an das 3'-Ende eines Gens unter Kontrolle von P <sub>xyl</sub> , Kan <sup>R</sup>	[170]
pXVENC-2	Integrationsplasmid zur Fusion von <i>venus</i> an das 3'-Ende eines Gens unter Kontrolle von P <sub>xyl</sub> , Kan <sup>R</sup>	[170]
pXVENN-1	Integrationsplasmid zur Fusion von <i>venus</i> an das 5'-Ende eines Gens unter Kontrolle von P <sub>xyl</sub> , Strep/Spec <sup>R</sup>	[170]
pKL7	pNPTS138-Derivat zum Ersetzen von nativem CC1873 mit CC1873-HA	DA K. Leser, [95]
pKL8	pNPTS138-Derivat zum Ersetzen von nativem CC3022 mit CC3022-HA	DA K. Leser, [95]
pMT766	pXVENC-2 CC3022	[95]
pMT810	pXCFPC-2 CC1873	[95]
pMT812	pXVENC-2 CC1873	[95]
pMT813	pNPTS138-Derivat zur <i>in-frame</i> Deletion von CC1873	[95]
pMT815	pNPTS138-Derivat zur <i>in-frame</i> Deletion von CC3022	[95]
pMT820	pNPTS138-Derivat zum Ersetzen von nativem CC1873 mit CC1873- <i>ecfp</i>	[95]
pMT821	pNPTS138-Derivat zum Ersetzen von nativem CC3022 mit CC3022- <i>venus</i>	[95]
pMT879	pET21a(+) CC1873	[95]
pMT906	pXVENN-1 CC3277	[95]
pMT953	pJP5603-Derivat zur Fusion von <i>mCherry</i> an das 3'-Ende von nativem SO1662	[95]
pMT978	pKO1Km-Derivat zum Ersetzen von nativem MXAN4635 mit MXAN4635- <i>mCherry</i>	[95]
pMT979	pKO1Km-Derivat zum Ersetzen von nativem MXAN4636 mit MXAN4636- <i>mCherry</i>	[95]
pMT980	pKO1Km-Derivat zum Ersetzen von nativem MXAN4637 mit MXAN4637- <i>mCherry</i>	[95]
pMT981	pKO1Km-Derivat zur <i>in-frame</i> Deletion von MXAN7475	[95]
pMT982	pKO1Km-Derivat zur <i>in-frame</i> Deletion von MXAN4635-7	[95]
pMT984	pET21a(+) MXAN7475	[95]
pMT985	pKO1Km-Derivat zum Ersetzen von nativem MXAN7475 mit <i>mCherry</i> -MXAN7475	[95]
pMT986	pET21a SO1662	[95]
pMT993	pXCHYC-2 CC3277(n t1-396)	[95]
pMT999	pNPTS138-Derivat zur <i>in-frame</i> Deletion von CC3277	[95]
pSW17	pET21a(+) MXAN4636	[95]

Fortsetzung auf nächster Seite

**Tabelle 5.2:** Fortsetzung: Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pSW20	pET28a(+) MXAN4635	[95]
pJK03	pNPTS138-Derivat zur <i>in-frame</i> Deletion von <i>phoB</i>	diese Arbeit
pJK04	pBXMCS-2 CC1873	diese Arbeit, [95]
pJK06	pBXMCS-2 CC3022	diese Arbeit, [95]
pJK07	pBAD24 CC3022	diese Arbeit, [95]
pJK08	pBAD24 CC1873	diese Arbeit, [95]
pJK13	pBXMCS-2 CC1873- <i>venus</i>	diese Arbeit, [95]
pJK14	pBXMCS-2 CC3022- <i>venus</i>	diese Arbeit, [95]
pJK15	pVVENN-4-Derivat zur Komplementation von <i>phoB</i>	diese Arbeit
pJK16	pBXMCS-6 CC1873- <i>venus</i>	diese Arbeit, [95]
pJK17	pBXMCS-6 CC3022- <i>venus</i>	diese Arbeit, [95]
pJK18	pPR9TT <i>pstC</i> -Promotor	diese Arbeit
pJK19	pNPTS138-Derivat zur <i>in-frame</i> Deletion von <i>pstS</i>	diese Arbeit
pJK25	pNPTS138-Derivat zur <i>in-frame</i> Deletion von <i>pstS</i> und Einsetzen der $\Omega$ -Kassette	diese Arbeit
pJK26	pVVENN-4-Derivat zur Komplementation von <i>pstS</i>	diese Arbeit
pJK27	pNPTS138 R6KT-Derivat zur <i>in-frame</i> Deletion von SO1662	diese Arbeit
pJK29	pNPTS138-Derivat zur <i>in-frame</i> Deletion von CC0170-0183	diese Arbeit
pJK31	pNPTS138-Derivat zur <i>in-frame</i> Deletion von CC0754-0757	diese Arbeit
pJK32	pNPTS138-Derivat zur <i>in-frame</i> Deletion von CC0996	diese Arbeit
pJK33	pNPTS138-Derivat zur <i>in-frame</i> Deletion von CC1373	diese Arbeit
pJK34	pNPTS138-Derivat zur <i>in-frame</i> Deletion von CC2225	diese Arbeit
pJK35	pNPTS138-Derivat zur <i>in-frame</i> Deletion von CC3094	diese Arbeit
pJK36	pNPTS138-Derivat zur <i>in-frame</i> Deletion von CC3329-3330	diese Arbeit
pJK37	pNPTS138-Derivat zur <i>in-frame</i> Deletion von CC3677	diese Arbeit
pJK38	pXVENC-2 CC0996	diese Arbeit
pJK39	pXVENC-2 CC1373	diese Arbeit
pJK40	pXVENC-2 CC2225	diese Arbeit
pJK41	pXVENC-2 CC3094	diese Arbeit
pJK42	pXVENC-2 CC3329	diese Arbeit
pJK43	pXVENC-2 CC3330	diese Arbeit
pJK44	pBAD24CB <i>ybcA-mCherry</i>	diese Arbeit
pJK45	pXVENN-4 CC1373	diese Arbeit
pJK46	pXVENN-4 CC2225	diese Arbeit
pJK47	pXVENN-4 CC3329	diese Arbeit
pJK48	pXCHYN-2 CC3330	diese Arbeit
pJK49	pXVENN-4 CC0996	diese Arbeit
pJK50	pXVENN-4 CC3094	diese Arbeit
pJK51	pXVENC-2 DUF583(CC1873)	diese Arbeit
pJK52	pBXMCS-2 DUF583(CC1873)	diese Arbeit
pJK53	pBXMCS-2 CC1873- <i>ecfp</i>	diese Arbeit, [95]
pJK54	pBXMCS-2 DUF583(CC1873)- <i>venus</i>	diese Arbeit
pJK58	pXCHYC-2 CC3277(nt1-255)- <i>mreC</i> (nt160-196)-CC2007(nt160-189)	diese Arbeit, [95]
pJK72	pXVENC-2 CC1873(L73S V75S)	BA N. Schnaß
pJK73	pBXMCS-2 CC1873(L73S V75S)- <i>venus</i>	BA N. Schnaß
pJK80	pNPTS138-Derivat zur <i>in-frame</i> Deletion von CC0170	diese Arbeit
pJK81	pNPTS138-Derivat zur <i>in-frame</i> Deletion von CC0171-0183	diese Arbeit
pJK83	pET21a(+) CC3022opt	diese Arbeit
pJK86	pXCHYC-2 CC0176	diese Arbeit
pJK87	pXGFPC-2 CC0179	diese Arbeit
pJK90	pXblaMC-2 CC0170	diese Arbeit

**Tabelle 5.3:** Verwendete Stämme. Abkürzungen DA: Diplomarbeit, BA: Bachelorarbeit.

Stamm	Genotyp	Referenz
CS606	CB15N $\Delta$ CC2137	[190]
DK1217	<i>aglB1</i> , A- S+	[82]
DK10416	<i>pilB</i> , A+ S-	[196]
KL7	CB15N <i>bacA</i> -HA	DA K. Leser, [95]
KL8	CB15N <i>bacB</i> -HA	DA K. Leser, [95]
LS3779 = UJ506	CB15N $\Delta$ <i>pleC</i>	[3]
MT257	CB15N $\Delta$ <i>bacA</i>	[95]
MT259	CB15N $\Delta$ <i>bacB</i>	[95]
MT260	CB15N <i>bacA-ecfp</i>	[95]
MT262	CB15N <i>bacB-venus</i>	[95]
MT279	CB15N <i>xylX::P<sub>xyl</sub>-venus-pbpC</i>	[95]
MT288	MR-1 SO1662- <i>mCherry</i>	[95]
MT295	DK1622 $\Delta$ MXAN4635-MXAN4637	[95]
MT296	DK1622 MXAN4635- <i>mCherry</i>	[95]
MT297	DK1622 MXAN4636- <i>mCherry</i>	[95]
MT298	DK1622 MXAN4637- <i>mCherry</i>	[95]
MT299	DK1622 <i>mCherry</i> -MXAN7475	[95]
MT300	DK1622 $\Delta$ MXAN7475	[95]
MT304	CB15N $\Delta$ <i>pbpC</i>	[95]
SW63	CB15N <i>xylX::P<sub>xyl</sub>-CC0170-mCherry</i>	diese Arbeit
SW65	CB15N <i>xylX::P<sub>xyl</sub>-CC0171-mCherry</i>	diese Arbeit
JK003	CB15N $\Delta$ <i>phoB</i>	diese Arbeit
JK005	CB15N $\Delta$ CC1873 $\Delta$ CC3022	diese Arbeit, [95]
JK034	CB15N CC1873- <i>ecfp</i> CC3022- <i>venus</i>	diese Arbeit, [95]
JK061	CB15N $\Delta$ <i>phoB</i> <i>vanA::P<sub>van</sub>-phoB</i>	diese Arbeit
JK090	CB15N <i>xylX::P<sub>xyl</sub>-eyfp-mreB</i>	diese Arbeit, [95]
JK133	CB15N $\Delta$ CC1873 <i>xylX::P<sub>xyl</sub>-venus-CC3277</i>	diese Arbeit, [95]
JK134	CB15N $\Delta$ CC3022 <i>xylX::P<sub>xyl</sub>-venus-CC3277</i>	diese Arbeit, [95]
JK135	CB15N $\Delta$ CC1873 $\Delta$ CC3022 <i>xylX::P<sub>xyl</sub>-venus-CC3277</i>	diese Arbeit, [95]
JK136	CB15N $\Delta$ CC3277 <i>xylX::P<sub>xyl</sub>-CC1873-venus</i>	diese Arbeit, [95]
JK137	CB15N $\Delta$ CC3277 <i>xylX::P<sub>xyl</sub>-CC3022-venus</i>	diese Arbeit, [95]
JK161	CB15N $\Delta$ <i>pstS</i> $\Omega$ <i>vanA::P<sub>van</sub>-pstS</i>	diese Arbeit
JK168	MR-1 $\Delta$ SO1662	diese Arbeit
JK180	CB15N <i>xylX::P<sub>xyl</sub>-CC1373-venus</i>	diese Arbeit
JK182	CB15N <i>xylX::P<sub>xyl</sub>-CC3329-venus</i>	diese Arbeit
JK184	CB15N <i>xylX::P<sub>xyl</sub>-CC0996-venus</i>	diese Arbeit
JK186	CB15N <i>xylX::P<sub>xyl</sub>-CC2225-venus</i>	diese Arbeit
JK188	CB15N <i>xylX::P<sub>xyl</sub>-CC3094-venus</i>	diese Arbeit
JK190	CB15N <i>xylX::P<sub>xyl</sub>-CC3330-venus</i>	diese Arbeit
JK192	CB15N $\Delta$ CC0170-0183	diese Arbeit
JK196	CB15N $\Delta$ CC0754-0757	diese Arbeit
JK198	CB15N $\Delta$ CC0996	diese Arbeit
JK200	CB15N $\Delta$ CC2225	diese Arbeit
JK202	CB15N $\Delta$ CC3094	diese Arbeit
JK204	CB15N $\Delta$ CC3329-3330	diese Arbeit
JK206	CB15N $\Delta$ CC3677	diese Arbeit
JK216	CB15N $\Delta$ CC1373	diese Arbeit
JK217	CB15N <i>xylX::P<sub>xyl</sub>-venus-CC1373</i>	diese Arbeit
JK219	CB15N <i>xylX::P<sub>xyl</sub>-venus-CC2225</i>	diese Arbeit
JK221	CB15N <i>xylX::P<sub>xyl</sub>-venus-CC3329</i>	diese Arbeit
JK223	CB15N <i>xylX::P<sub>xyl</sub>-mCherry-CC3330</i>	diese Arbeit
JK229	CB15N <i>xylX::P<sub>xyl</sub>-venus-CC0996</i>	diese Arbeit
JK231	CB15N <i>xylX::P<sub>xyl</sub>-venus-CC3094</i>	diese Arbeit
JK247	CB15N <i>xylX::P<sub>xyl</sub>-DUF583(CC1873)-venus</i>	diese Arbeit
JK271	CB15N CC1873- <i>ecfp</i> <i>xylX::P<sub>xyl</sub>-venus-CC3277</i>	diese Arbeit, [95]
JK279	CB15N $\Delta$ CC3277 <i>xylX::P<sub>xyl</sub>-CC3277(nt1-396)-mCherry</i>	diese Arbeit, [95]

Fortsetzung auf nächster Seite



**Tabelle 5.3:** Fortsetzung: Verwendete Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
JK281	CB15N $\Delta$ CC1873 $\Delta$ CC3022 $\Delta$ CC3277	diese Arbeit, [95]
JK287	CB15N $\Delta$ CC1873 $\Delta$ CC3022 $\Delta$ CC3277	diese Arbeit, [95]
JK289	<i>xylX::P<sub>xyl</sub>-CC3277(nt1-255)-mreC(nt160-196)-CC2007(nt160-189)-mCherry</i>	
JK291	CB15N $\Delta$ CC1873 $\Delta$ CC3022 $\Delta$ CC3277 <i>xylX::P<sub>xyl</sub>-CC3277(nt1-396)-mCherry</i>	diese Arbeit, [95]
	CB15N $\Delta$ CC3277	diese Arbeit, [95]
	<i>xylX::P<sub>xyl</sub>-CC3277(nt1-255)-mreC(nt160-196)-CC2007(nt160-189)-mCherry</i>	
JK295	CB15N $\Delta$ CC3277 <i>xylX::P<sub>xyl</sub>-mCherry-C3277</i>	diese Arbeit, [95]
JK308	CB15N $\Delta$ CC3277 <i>xylX::P<sub>xyl</sub>-venus-CC3277</i>	diese Arbeit, [95]
JK310	CB15N $\Delta$ CC1873 $\Delta$ CC3022 $\Delta$ CC3277 <i>xylX::P<sub>xyl</sub>-venus-CC3277</i>	diese Arbeit, [95]
JK326	DK1622 $\Delta$ MXAN4635-37 <i>mCherry</i> -MXAN7475	diese Arbeit, [95]
JK328	DK1622 $\Delta$ MXAN4635-37 $\Delta$ MXAN7475	diese Arbeit, [95]
JK336	CB15N <i>xylX::P<sub>xyl</sub>-bacA(L73S V75S)-venus</i>	BA N. Schnaß
JK360	CB15N $\Delta$ CC0170	diese Arbeit
JK362	CB15N $\Delta$ CC0171-0183	diese Arbeit
JK364	CB15N <i>xylX::P<sub>xyl</sub>-CC0176-mCherry</i>	diese Arbeit
JK366	CB15N <i>xylX::P<sub>xyl</sub>-CC0179-egfp</i>	diese Arbeit
JK368	CB15N $\Delta$ CC2137 <i>xylX::P<sub>xyl</sub>-CC0170-blaM</i>	diese Arbeit
JK372	CB15N $\Delta$ CC2137 $\Delta$ CC0171-0183 <i>xylX::P<sub>xyl</sub>-CC0170-blaM</i>	diese Arbeit
<i>Caulobacter</i> -Stämme mit Plasmid		
JK064	CB15N pJK18	diese Arbeit
JK006	CB15N pJK4	diese Arbeit, [95]
JK012	CB15N pJK6	diese Arbeit, [95]
JK049	CB15N pJK13	diese Arbeit, [95]
JK052	CB15N pJK14	diese Arbeit, [95]
JK084	CB15N <i>creS::Tn5</i> pJK16	diese Arbeit, [95]
JK087	CB15N <i>creS::Tn5</i> pJK17	diese Arbeit, [95]
JK227	CB15N CC1873- <i>ecfp</i> pJK14	diese Arbeit, [95]
JK241	CB15N pJK52	diese Arbeit
JK253	CB15N pJK54	diese Arbeit
JK255	CB15N $\Delta$ CC3277 pJK4	diese Arbeit, [95]
JK273	CB15N <i>xylX::P<sub>xyl</sub>-venus-CC3277</i> pJK53	diese Arbeit, [95]
JK312	CB15N $\Delta$ CC1873 $\Delta$ CC3022 pJK14	diese Arbeit, [95]
JK318	CB15N $\Delta$ CC1873 $\Delta$ CC3022 pJK53	diese Arbeit, [95]
JK338	CB15N pJK73	BA N. Schnaß

## 5.2 Unter Phosphatmangel regulierte Gene

**Tabelle 5.4:** Gene mit verstärkter Expression bei Kultivierung in M2G<sup>-P</sup>-Medium. Die Gene sind nach COG-Klassifizierung geordnet und die Regulation als log<sub>2</sub>Ratio angegeben. Bemerkungen: A - Regulation abhängig von PhoB, B - besitzt mögliche Pho-Box, C - auch in einem  $\Delta$ pstS-Stamm reguliert, D - Deletionsstamm und F - Fluoreszenzfusion konstruiert

ID	1 h	2,5 h	6 h	Produkt	Bemerkung
Aminosäuremetabolismus					
CC_0195	3,540	3,565	1,627	3-isopropylmalate dehydratase, small subunit	
CC_0196	3,043	3,091	1,799	isopropylmalate isomerase large subunit	B
CC_0581	5,374	4,823	4,618	arginine N-succinyltransferase	C
CC_0583	7,353	7,163	6,280	succinylarginine dihydrolase	C
CC_0584	4,771	4,936	3,704	succinylornithine transaminase, putative	C
CC_0939	1,156	1,633	2,200	isopenicillin N epimerase, putative	A, C
CC_1071	2,280	1,367	1,671	putative aminotransferase	
CC_1091	3,267	2,135	1,015	amine oxidase, flavin-containing	
CC_1339	2,649	1,460	1,730	nitrogen regulatory protein P-II 2	B
CC_1541	4,363	4,954	3,925	2-isopropylmalate synthase	
CC_1924	4,242	6,071	6,338	phosphoserine phosphatase	A, C
CC_1969	3,418	2,792	2,907	glutamine synthetase, class I	
CC_1986	1,140	1,380	1,642	prolyl oligopeptidase family protein	
CC_2055	1,995	2,221	2,538	phosphogluconate dehydratase	
CC_2100	2,273	2,860	1,523	acetolactate synthase 3 catalytic subunit	
CC_2101	1,785	1,784	1,224	acetolactate synthase 3 regulatory subunit	
CC_2120	1,724	2,423	1,105	ketol-acid reductoisomerase	
CC_2671	1,655	2,053	1,131	hypothetical protein	
CC_2746	1,669	1,937	2,406	dipeptidase	
CC_3044	2,395	3,045	2,891	dihydroxy-acid dehydratase	
CC_3096	1,117	2,511	1,937	hypothetical protein	
CC_3130	2,118	2,458	1,968	glutamine synthetase family protein	
CC_3134	2,048	2,014	1,331	spermidine/putrescine ABC transporter, ATP-binding protein	
CC_3137	2,134	2,733	1,953	spermidine/putrescine ABC transporter, periplasmic spermidine/putrescine-binding protein	
CC_3606	3,101	3,661	2,712	glutamate synthase, small subunit	
CC_3607	3,004	3,727	2,815	glutamate synthase, large subunit	
CC_3625	1,666	2,481	2,335	cysteine synthase	
Kohlenhydratmetabolismus					
CC_0797	2,656	3,909	3,944	1,4-beta-D-glucan glucohydrolase D	
CC_1103	2,138	2,760	1,985	sugar transporter, fucose permease family	
CC_1495	1,527	2,062	1,440	keto-hydroxyglutarate-aldolase/keto-deoxy-phosphogluconate aldolase	
CC_1903	1,488	1,676	1,663	hypothetical protein	
CC_2051	2,233	2,343	2,117	pyruvate kinase	
CC_2054	1,117	1,481	1,386	glucokinase	
CC_2056	1,540	1,742	1,631	6-phospho-glucono-lactonase	
CC_2136	1,715	2,137	3,917	beta-glucosidase	
CC_2282	4,645	5,118	3,468	glucoamylase	
CC_2283	3,451	3,891	1,792	transporter, putative	
CC_2285	4,349	4,503	2,761	alpha amylase family protein	
CC_2286	3,897	4,121	2,549	alpha amylase family protein	
Coenzymmetabolismus					
CC_0618	5,713	3,283	4,633	siroheme synthase	
CC_0885	4,410	3,859	4,143	riboflavin biosynthesis protein RibD	
CC_0886	4,239	3,549	3,406	riboflavin synthase subunit alpha	
CC_0887	6,276	6,274	6,480	3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase/GTP cyclohydrolase II	

Fortsetzung auf nächster Seite

**Tabelle 5.4:** Fortsetzung: Gene mit verstärkter Expression bei Kultivierung in M2G<sup>-P</sup>-Medium.

ID	1 h	2,5 h	6 h	Produkt	Bemerkung
CC_0888	3,657	3,711	3,440	riboflavin synthase, beta subunit	
CC_1118	1,184	1,821	1,154	sirohaem synthase	
CC_3132	1,199	1,694	1,277	putative aminotransferase	
CC_3746	1,356	1,684	1,812	hypothetical protein	
Energistoffwechsel					
CC_0022	1,359	2,180	1,980	isoquinoline 1-oxidoreductase, alpha subunit	
CC_0096	1,725	2,691	2,431	alcohol dehydrogenase, zinc-containing	
CC_0193	2,812	2,974	1,874	3-isopropylmalate dehydrogenase	
CC_0555	1,251	2,595	3,202	hypothetical protein	
CC_0582	4,410	4,220	2,945	succinylglutamic semialdehyde dehydrogenase	C
CC_0615	4,488	3,495	4,606	nitrite reductase [NAD(P)H], large subunit	A
CC_0617	4,681	2,124	3,210	NasA/NapA/NarB nitrate reductase, large subunit	
				family protein	
CC_0763	1,130	2,123	2,216	cytochrome d ubiquinol oxidase subunit II	
CC_1210	1,059	1,540	1,115	cytochrome c family protein	B
CC_1404	2,021	3,279	2,127	cytochrome c oxidase, CcoP subunit	
CC_1493	2,652	2,706	1,290	phosphoenolpyruvate carboxylase	
CC_1764	2,404	4,689	6,477	isocitrate lyase	
CC_1849	1,392	2,345	2,191	coniferyl aldehyde dehydrogenase	
CC_2288	3,373	2,859	1,401	tryptophan halogenase, putative	
CC_2396	1,144	2,147	2,404	benzyl-alcohol dehydrogenase	
CC_2516	2,574	2,909	1,497	alcohol dehydrogenase, class III	
CC_2798	2,642	1,867	3,147	hypothetical protein	
CC_3085	1,967	3,550	4,569	alcohol dehydrogenase	
CC_3172	4,501	6,165	7,039	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase, putative	A, C
CC_3272	1,683	3,024	3,728	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	A, C
CC_3304	2,417	2,771	2,337	NAD(P) transhydrogenase, alpha2 subunit	
CC_3305	2,446	3,044	2,692	NAD(P) transhydrogenase, alpha subunit	
CC_3580	1,271	3,699	4,166	aldehyde dehydrogenase B	
CC_3759	1,217	2,228	2,647	quinone oxidoreductase	C
Lipidmetabolismus					
CC_0947	1,075	1,667	1,910	enoyl-CoA hydratase	
CC_1856	1,179	1,967	2,844	acyltransferase family protein	
CC_2050	1,112	2,339	2,293	acyl-CoA dehydrogenase family protein	
CC_2093	1,317	2,023	1,118	3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase, putative	
CC_2575	1,087	2,207	1,789	enoyl-CoA hydratase	
CC_3441	2,396	3,880	3,298	arylesterase-related protein	
Nukleotidmetabolismus					
CC_0544	2,432	5,488	6,920	nuclease, putative	C
CC_1277	1,137	3,098	3,106	type I phosphodiesterase/nucleotide pyrophosphatase family protein	A, C
Sekundärmetabolismus					
CC_0087	1,324	1,470	1,289	hypothetical protein	
CC_0300	1,573	2,296	2,510	Xaa-Pro dipeptidase, putative	
CC_0477	1,769	2,335	1,189	dienelactone hydrolase family protein	
CC_0478	2,604	3,613	2,217	dienelactone hydrolase, putative	C
CC_0940	1,099	2,748	3,364	acylase, putative	A,B
CC_0946	1,207	2,248	2,173	cytochrome P450 family protein	
CC_1973	1,203	1,863	1,181	hypothetical protein	
CC_2230	1,164	2,865	1,689	hydrolase, alpha/beta hydrolase fold family	
CC_2358	1,784	3,663	3,685	dienelactone hydrolase family protein	C
CC_2515	2,793	2,937	1,369	esterase	
CC_2763	1,044	1,662	1,229	hydrolase, alpha/beta hydrolase fold family	
CC_2795	3,215	2,244	3,240	isochorismatase family protein	

Fortsetzung auf nächster Seite

**Tabelle 5.4:** Fortsetzung: Gene mit verstärkter Expression bei Kultivierung in M2G<sup>-P</sup>-Medium.

ID	1 h	2,5 h	6 h	Produkt	Bemerkung
CC_2797	2,670	2,200	2,488	hydrolase, alpha/beta hydrolase fold family	
CC_3758	1,585	2,645	2,730	carboxymethylenebutenolidase	C
Zellwand/ Membranbiogenese					
CC_0201	2,659	3,282	3,206	OmpA family protein	
CC_0747	2,545	3,335	3,269	OmpA family protein	
CC_0755	1,022	2,356	1,175	glycosyl transferase, group 1 family protein	A
CC_0756	4,186	5,401	6,435	glycosyl transferase, group 1 family protein	A, C
CC_0798	1,594	2,260	1,896	sialic acid-specific 9-O-acetylesterase, putative	
CC_1695	1,994	2,120	2,703	hypothetical protein	
CC_1958	1,158	1,616	2,303	glycosyl transferase, group 1 family protein	A
CC_2092	1,390	2,523	1,236	HlyD family secretion protein	
CC_2294	2,058	3,382	2,470	outer membrane protein	
CC_2379	1,009	2,342	2,014	UDP-glucose 6-dehydrogenase	
CC_2601	1,360	2,245	2,542	hypothetical protein	
CC_2868	1,294	1,089	1,275	neuB protein, putative	
CC_3031	1,978	3,528	3,937	phospholipase C	A, C
CC_3229	1,779	1,772	1,600	OmpA family protein	
CC_3637	1,257	1,952	2,138	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	
Motilität/ Chemotaxis					
CC_2065	1,598	2,125	1,913	distal basal-body ring component protein FlaD	
CC_2066	1,785	1,905	1,758	flagellar basal body L-ring protein	B
CC_3349	1,975	2,138	3,816	methyl-accepting chemotaxis protein McpH	C
CC_3358	1,410	1,261	1,685	methyl-accepting chemotaxis protein McpL	
Abwehr					
CC_2091	1,170	1,414	1,362	ABC transporter, ATP-binding protein	
CC_2200	2,140	3,930	4,422	HNH endonuclease family protein	A, B, C
Transport und Metabolismus von Ionen					
CC_0210	1,311	1,567	1,387	TonB-dependent receptor	C
CC_0291	1,673	2,605	1,700	phosphate ABC transporter, permease protein PstA	C
CC_0292	1,540	2,578	1,977	phosphate ABC transporter, ATP-binding protein PstB	C
CC_0293	1,500	1,924	1,808	phosphate transport regulon regulator PhoU	C
CC_0454	3,487	5,340	5,514	TonB-dependent receptor	A, B, C
CC_0455	2,277	3,475	4,013	alkaline phosphatase, putative	A, C
CC_0609	4,421	3,628	4,645	nitrate ABC transporter, periplasmic nitrate-binding protein	A
CC_0610	3,015	2,321	3,569	nitrate ABC transporter, permease protein	A
CC_0611	2,598	1,475	2,975	nitrate ABC transporter, ATP-binding protein	
CC_0614	3,919	2,475	3,851	nitrate transporter, NarK/NasA family	
CC_0616	3,714	2,447	3,145	nitrite reductase [NAD(P)H], small subunit	A
CC_0722	6,112	7,692	7,105	TonB-dependent receptor	A, B, C
CC_0737	2,444	3,524	3,129	Rieske 2Fe-2S family protein	A, C
CC_0774	1,283	2,101	1,948	monooxygenase, flavin-binding family	
CC_0925	1,123	1,117	1,130	OmpA-related protein	B
CC_0995	4,900	5,971	5,223	TonB-dependent receptor, putative	A, B, C
CC_1113	1,484	5,294	6,111	TonB-dependent receptor	A, C
CC_1119	1,179	1,513	1,509	sulfite reductase (NADPH) hemoprotein beta-component	
CC_1338	3,822	2,872	2,590	ammonium transporter	
CC_1425	1,083	1,833	1,323	rhodanese family protein	
CC_1515	1,372	2,174	1,663	phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding protein PstS, putative	A, B
CC_1565	1,157	2,333	2,573	alkaline phosphatase D	A, C
CC_1579	1,332	1,628	1,590	superoxide dismutase, Cu-Zn	
CC_1592	5,631	5,491	3,592	potassium-transporting ATPase, B subunit	

Fortsetzung auf nächster Seite

**Tabelle 5.4:** Fortsetzung: Gene mit verstärkter Expression bei Kultivierung in M2G<sup>-P</sup>-Medium.

ID	1 h	2,5 h	6 h	Produkt	Bemerkung
CC_1593	2,805	2,432	1,141	potassium-transporting ATPase, C subunit	
CC_2149	5,764	6,984	6,741	TonB-dependent receptor	A, C
CC_2287	7,699	8,958	5,111	TonB-dependent receptor	
CC_2709	1,152	1,655	2,034	TonB-dependent receptor	
CC_2924	4,893	8,134	6,923	TonB-dependent receptor	A, C
Sekretion					
CC_0170	5,373	6,633	6,449	hypothetical protein	A, C, D, F
CC_0171	4,524	5,660	5,630	TonB-dependent receptor	A, C, D, F
CC_0172	2,238	2,498	2,063	general secretion pathway protein C, putative	A, C, D
CC_0173	2,495	2,817	2,374	general secretion pathway protein D	A, C, D
CC_0174	3,123	3,351	3,087	general secretion pathway protein E	A, C, D
CC_0175	2,249	2,462	2,205	general secretion pathway protein F	A, C, D
CC_0176	2,798	3,116	2,693	general secretion pathway protein G	A, C, D, F
CC_0177	2,602	3,264	2,569	general secretion pathway protein H, putative	A, C, D
CC_0178	1,624	2,261	1,625	general secretion pathway protein I	A, C, D
CC_0179	1,816	1,769	1,481	general secretion pathway protein J	A, C, D, F
CC_0181	1,768	2,595	1,713	general secretion pathway protein L, putative	A, C, D
CC_0182	1,046	1,648	1,521	general secretion pathway protein M, putative	A, C, D
CC_0183	1,999	2,722	1,987	general secretion pathway protein N, putative	A, C, D
Transkription					
CC_0884	2,797	1,750	2,291	transcriptional regulator, putative	
CC_0919	1,064	1,109	1,786	transcriptional regulator, TetR family	
CC_1356	2,477	2,253	2,684	transcriptional regulator	
CC_2399	1,307	1,937	2,209	transcriptional regulator, AraC family	
CC_2883	1,749	2,702	3,366	RNA polymerase sigma-70 factor, ECF subfamily	
CC_3367	1,053	1,445	1,233	transcriptional activator FtrA	
CC_3475	1,226	1,662	1,958	RNA polymerase sigma-70 factor, ECF subfamily	
CC_3477	1,579	2,174	2,078	two-component response regulator	
CC_3508	1,833	3,019	2,918	hypothetical protein	C
CC_3677	3,757	4,641	4,762	transcriptional regulator, MarR family	A, B, C, D
Translation					
CC_2796	3,136	2,201	2,790	hypothetical protein	
Posttranslationale Modifikation/ Proteinabbau/ Chaperon					
CC_0217	1,866	2,202	2,164	thio:disulfide interchange protein, putative	
CC_0889	1,044	1,436	1,102	leucine aminopeptidase-related protein	
CC_0994	1,019	1,299	1,145	methionine sulfoxide reductase A	
CC_1039	1,357	1,793	1,170	peptide methionine sulfoxide reductase	
CC_2544	1,031	1,833	1,246	aminopeptidase, putative	
CC_3375	1,097	2,203	2,712	band 7/Mec-2 family protein	
Replikation/ Rekombination/ Reparatur					
CC_1236	1,902	2,108	2,622	ISCC1, transposase OrfB	
CC_2823	1,563	2,463	1,641	TldD/PmbA family protein	
CC_2824	1,911	2,362	1,683	TldD/PmbA family protein	
Signaltransduktion					
CC_0026	1,765	1,952	2,388	sensory box histidine kinase/response regulator	C
CC_0294	1,825	2,333	2,673	phosphate regulon response regulator PhoB	C
CC_0612	2,825	1,044	1,702	response regulator NasT	
CC_0791	1,348	1,926	1,088	TrpR binding protein WrbA	
CC_2993	1,370	2,005	1,576	sensor histidine kinase/response regulator	B
CC_3094	2,476	3,232	3,825	sensory box/GGDEF family protein	A, C, D, F
Zellzykluskontrolle/ Zellteilung/ Chromosomensegregation					
CC_1537	1,555	3,385	5,872	ParA family protein	C

Fortsetzung auf nächster Seite

**Tabelle 5.4:** Fortsetzung: Gene mit verstärkter Expression bei Kultivierung in M2G<sup>-P</sup>-Medium.

ID	1 h	2,5 h	6 h	Produkt	Bemerkung
Unbekannte Funktion					
CC_0221	1,770	1,160	1,341	hypothetical protein	B
CC_0280	2,533	3,364	4,443	hypothetical protein	
CC_0421	1,442	1,398	3,093	hypothetical protein	C
CC_0547	1,663	1,637	1,356	hypothetical protein	
CC_0550	2,621	4,069	5,729	hypothetical protein	
CC_0554	2,380	3,851	4,056	hypothetical protein	
CC_0556	1,595	2,350	2,907	hypothetical protein	
CC_0557	1,507	2,569	2,871	hypothetical protein	A, B
CC_0558	1,758	3,178	4,100	hypothetical protein	
CC_0559	2,532	4,097	5,148	hypothetical protein	A, C, D
CC_0608	6,452	5,712	7,098	hypothetical protein	
CC_0754	1,199	2,299	1,716	hypothetical protein	A, C, D
CC_0757	1,678	3,071	3,810	permease, putative	
CC_0781	2,201	3,469	3,042	hypothetical protein	C
CC_0846	1,584	3,020	2,495	hypothetical protein	
CC_0862	1,210	2,082	2,187	endonuclease/ exonuclease/ phosphatase, putative	A, B, C
CC_0938	1,518	1,314	3,310	hypothetical protein	
CC_0996	4,531	5,146	3,591	hypothetical protein	A, C, D, F
CC_0997	1,034	1,078	1,572	hypothetical protein	
CC_1032	1,209	1,023	1,704	hypothetical protein	C
CC_1068	1,653	1,907	2,555	hypothetical protein	
CC_1112	1,347	5,168	5,433	metal-dependent hydrolase	A, C
CC_1115	1,084	1,065	1,200	hypothetical protein	
CC_1120	1,394	2,146	2,020	hypothetical protein	C
CC_1178	3,223	4,134	4,939	hypothetical protein	
CC_1179	2,531	3,573	3,397	hypothetical protein	A, B, C
CC_1202	3,114	4,077	5,354	hypothetical protein	
CC_1375	3,660	4,500	4,504	phosphatase, putative	B
CC_1379	1,652	1,730	1,921	hypothetical protein	
CC_1453	1,503	2,548	3,317	hypothetical protein	C
CC_1462	1,125	1,460	2,186	hypothetical protein	
CC_1469	1,565	1,925	2,792	hypothetical protein	C
CC_1473	1,383	1,256	1,732	hypothetical protein	
CC_1532	3,760	4,702	5,024	hypothetical protein	C
CC_1650	1,033	1,328	1,520	hypothetical protein	
CC_1682	1,056	1,013	2,296	hypothetical protein	C
CC_1752	1,129	1,008	2,155	hypothetical protein	
CC_1978	1,630	1,520	2,000	hypothetical protein	A, B, C, D, F
CC_2119	1,181	3,160	3,539	hypothetical protein	
CC_2190	1,592	2,438	2,106	hypothetical protein	A, B, C, D, F
CC_2225	4,096	4,854	4,800	hypothetical protein	
CC_2226	1,276	2,196	1,831	EF hand domain protein	A, B, C
CC_2229	2,209	2,669	1,525	hypothetical protein	
CC_2257	1,642	2,355	1,715	hypothetical protein	A
CC_2267	1,072	1,187	1,375	hypothetical protein	
CC_2476	1,377	1,697	2,293	hypothetical protein	A, B, C, D, F
CC_2549	2,076	3,496	3,935	hypothetical protein	
CC_2609	1,105	2,043	2,645	hypothetical protein	A, B, C
CC_2745	2,565	2,786	3,369	hypothetical protein	
CC_2752	1,814	1,376	1,374	EF hand domain protein	A, B, C
CC_2800	3,804	4,492	5,698	hypothetical protein	
CC_2925	2,178	3,951	3,503	acid phosphatase, putative	A
CC_3003	1,128	1,358	3,063	hypothetical protein	
CC_3178	1,118	1,845	2,411	pirin-related protein	A, B, C, D, F
CC_3207	2,078	1,901	1,910	hypothetical protein	
CC_3260	1,049	1,329	1,939	hypothetical protein	A, B, C, D, F
CC_3329	2,390	2,598	3,317	hypothetical protein	

Fortsetzung auf nächster Seite



**Tabelle 5.4:** Fortsetzung: Gene mit verstärkter Expression bei Kultivierung in M2G<sup>-P</sup>-Medium.

ID	1 h	2,5 h	6 h	Produkt	Bemerkung
CC_3330	1,471	1,693	3,081	hypothetical protein	B, D, F
CC_3360	1,878	1,690	2,005	hypothetical protein	
CC_3419	1,166	1,946	2,385	hypothetical protein	
CC_3455	1,977	3,015	3,608	hypothetical protein	C
CC_3466	1,935	2,535	2,996	hypothetical protein	
CC_3473	1,351	1,100	2,169	hypothetical protein	
CC_3491	1,659	1,675	2,702	hypothetical protein	C
CC_3554	1,839	1,631	2,097	hypothetical protein	
CC_3558	1,765	2,538	2,746	hypothetical protein	
CC_3559	2,076	2,219	2,705	hypothetical protein	C
CC_3563	1,323	3,186	2,418	hypothetical protein	
CC_3675	1,222	1,552	1,204	hypothetical protein	
CC_3710	1,996	2,888	3,559	hypothetical protein	B
CC_3711	1,978	2,757	3,256	hypothetical protein	
CC_3741	1,214	1,536	1,172	hypothetical protein	

**Tabelle 5.5:** Gene mit verminderter Expression bei Kultivierung in M2G<sup>-P</sup>-Medium. Die Gene sind nach COG-Klassifizierung geordnet und die Regulation als log<sub>2</sub>Ratio angegeben. Bemerkungen: A - Regulation abhängig von PhoB, B - besitzt mögliche Pho-Box, C - auch in einem  $\Delta$ pstS-Stamm reguliert, D - Deletionsstamm und F - Fluoreszenzfusion konstruiert

ID	1 h	2,5 h	6 h	Produkt	Bemerkung
Aminosäuremetabolismus					
CC_0456	1,065	1,679	2,162	efflux protein, LysE family	A, C
CC_0716	1,313	2,881	3,661	L-lysine 2,3-aminomutase, putative	C
CC_0957	1,658	2,862	3,610	urocanate hydratase	
CC_0958	1,949	2,511	2,495	formiminoglutamase	
CC_0959	1,639	3,165	5,212	histidine ammonia-lyase	
CC_0984	1,529	2,619	2,573	gamma-glutamyltransferase	
CC_1299	2,126	1,636	1,894	iolD protein	
CC_1421	1,592	2,217	2,341	dihydroxy-acid dehydratase	
CC_1439	1,008	1,772	1,751	cystine ABC transporter, ATP-binding protein, putative	
CC_1612	1,593	3,814	3,546	phenylalanine 4-monooxygenase	
CC_2346	1,010	1,311	1,766	histidinol dehydrogenase	
CC_2603	3,626	4,118	2,963	allantoate amidohydrolase	
CC_2604	2,906	2,609	2,688	aminotransferase, class V	
CC_3735	1,081	1,541	3,369	imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisH	
Kohlenhydratmetabolismus					
CC_0308	1,309	2,119	1,361	inositol monophosphatase family protein	
CC_0631	1,052	2,004	1,339	hypothetical protein	
CC_0632	1,230	2,277	2,076	hypothetical protein	
CC_0859	2,350	1,320	2,605	sugar ABC transporter, periplasmic sugar-binding protein	
CC_0860	2,516	2,351	3,500	sugar ABC transporter, ATP-binding protein	
CC_1105	1,397	1,882	2,029	periplasmic beta-glucosidase	
CC_1298	2,848	2,855	3,006	iolC protein	
CC_1301	2,220	1,669	1,627	iolB protein	
CC_1418	1,529	1,106	1,897	aldose 1-epimerase	
CC_2006	1,034	1,398	1,612	glycosyl hydrolase, family 3	
CC_2357	1,445	2,096	1,571	beta-xylosidase	
CC_2605	3,303	3,659	3,098	hypothetical protein	
CC_3157	1,260	2,039	2,207	hypothetical protein	
CC_3167	1,688	1,179	1,821	glucokinase family protein	
Coenzymmetabolismus					
CC_3062	1,048	1,348	1,797	thiamine biosynthesis protein ApbE, putative	
CC_3158	1,882	2,772	3,402	6-pyruvoyl tetrahydrobiopterin synthase, putative	
CC_3619	1,041	1,485	1,611	NAD synthetase	
Energistoffwechsel					
CC_0047	1,233	1,340	2,783	inorganic pyrophosphatase	
CC_1302	1,910	1,164	1,604	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase, putative	B
CC_1643	1,462	2,018	2,142	hydrolase, haloacid dehalogenase-like family	
CC_2975	1,112	1,567	1,773	4-oxalocrotonate tautomerase	
CC_3176	2,663	3,163	3,357	indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase	
CC_3638	1,034	1,912	1,077	iron-sulfur-binding protein	
Lipidmetabolismus					
CC_1328	1,113	1,796	1,243	acyltransferase, putative	
CC_1734	1,569	2,929	1,685	lysophospholipase L2, putative	
CC_1736	1,542	2,267	2,671	hypothetical protein	C
CC_1813	1,717	1,836	1,464	enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein	
CC_2094	1,354	1,407	4,208	outer membrane protein, putative	B
CC_2170	1,487	2,093	2,683	propionyl-CoA carboxylase, beta subunit, putative	
CC_2219	1,089	1,079	1,441	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase	

Fortsetzung auf nächster Seite

**Tabelle 5.5:** Fortsetzung: Gene mit verminderter Expression bei Kultivierung in M2G<sup>-P</sup>-Medium.

ID	1 h	2,5 h	6 h	Produkt	Bemerkung
Nukleotidmetabolismus					
CC_0409	1,352	1,537	1,608	glutamine amidotransferase, class-I family protein	
CC_0961	2,120	2,775	3,503	N-formimino-L-glutamate deiminase	
CC_1681	2,014	2,548	2,633	guanylate kinase	
CC_1708	2,586	3,797	4,045	hypothetical protein	
CC_1889	1,218	1,766	1,932	ribonucleotide reductase-related protein	
CC_2117	1,401	2,080	1,789	hypothetical protein	
CC_2618	3,680	3,464	3,169	xanthine dehydrogenase, C-terminal subunit	
CC_3012	1,257	1,520	1,248	cytidine deaminase	
Sekundärmetabolismus					
CC_0200	1,163	1,049	1,620	oxidoreductase iron/ascorbate family	
CC_0960	2,356	4,405	4,902	imidazolonepropionase	
CC_1296	1,672	1,505	2,701	myo-inositol 2-dehydrogenase	
CC_1663	1,298	1,154	1,180	hypothetical protein	
CC_3696	1,223	1,874	2,065	ABC transporter, ATP-binding protein	
Zellwand/ Membranbiogenese					
CC_0052	1,577	2,406	1,347	apolipoprotein N-acyltransferase	
CC_0092	1,379	1,232	1,189	UDP-glucose 4-epimerase	
CC_0093	1,377	1,804	1,509	integral membrane protein	
CC_1010	1,367	1,364	2,768	GDP-mannose 4,6-dehydratase	
CC_1013	1,102	1,028	2,296	glycosyl transferase, group 1 family protein LpsD	
CC_1014	1,088	1,332	1,733	glycosyl transferase, group 1 family protein LpsE	
CC_1016	1,080	1,555	1,321	lpsE protein	
CC_1052	1,045	1,724	1,803	glycosyl transferase, group 1 family protein	B
CC_1140	1,346	2,038	2,226	dTDP-4-dehydrorhamnose reductase	
CC_1164	1,057	1,470	1,904	hypothetical protein	
CC_1167	2,307	3,117	3,614	hypothetical protein	
CC_1486	1,503	1,706	1,600	hypothetical protein	
CC_1782	1,132	1,284	1,620	PepSY-associated TM helix domain protein	
CC_1909	1,306	1,796	1,557	lipid-A-disaccharide synthase	
CC_1925	1,040	2,120	1,851	hypothetical protein	C
CC_2389	1,201	1,021	1,769	cation efflux system protein, putative	
CC_2607	3,489	3,778	3,971	hypothetical protein	
CC_2722	1,545	2,912	3,188	metal ion efflux membrane fusion protein family	
CC_2849	1,582	2,113	4,016	hypothetical protein	
CC_2860	2,069	2,814	3,310	glycosyl transferase, putative	
CC_3501	1,635	1,244	1,762	PepSY-associated TM helix domain protein	
CC_3640	1,400	1,714	1,783	rfaE protein	
CC_3754	1,384	1,718	1,937	glucose inhibited division protein B, putative	
Motilität/ Chemotaxis					
CC_0440	1,115	1,308	1,725	chemotaxis protein CheYIII	
CC_0588	1,060	2,325	1,101	chemotaxis protein CheYI	
CC_0598	1,787	2,309	1,568	chemotaxis protein methyltransferase CheR	
CC_2691	1,567	2,022	1,749	methyl-accepting chemotaxis protein McpF, putative	
CC_3040	1,569	2,430	2,152	flagellum-specific ATP synthase	
CC_3184	1,143	2,122	1,215	hypothetical protein	
Abwehr					
CC_0305	1,108	1,377	1,383	ABC transporter, HlyB/MsbA family	
CC_0826	1,527	2,197	2,317	hypothetical protein	
CC_1706	1,065	2,045	1,282	hypothetical protein	
Transport und Metabolismus von Ionen					
CC_0057	1,234	1,650	1,101	ferric uptake regulation protein	
CC_0139	1,491	1,344	1,590	TonB-dependent receptor	

Fortsetzung auf nächster Seite

**Tabelle 5.5:** Fortsetzung: Gene mit verminderter Expression bei Kultivierung in M2G<sup>-P</sup>-Medium.

ID	1 h	2,5 h	6 h	Produkt	Bemerkung
CC_0185	1,760	2,674	1,150	TonB-dependent receptor	
CC_0450	1,060	1,542	1,715	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter	
CC_0711	2,124	1,963	2,008	hypothetical protein	
CC_0982	1,600	2,899	1,174	regulatory protein PupR, putative	
CC_0983	1,912	1,975	1,363	TonB-dependent receptor	
CC_1777	2,192	2,577	2,457	superoxide dismutase, Mn	
CC_1781	2,046	1,521	3,790	TonB-dependent receptor	
CC_1799	1,140	1,497	1,194	steroid monooxygenase	
CC_2390	1,502	1,315	1,319	AcrB/AcrD/AcrF family protein	
CC_2804	1,306	1,089	2,771	TonB-dependent receptor	
CC_3063	1,520	1,792	1,730	sulfite reductase (NADPH) flavoprotein alpha-component	
CC_3194	1,487	1,279	2,020	TonB-dependent receptor	
CC_3263	2,604	3,773	3,448	hypothetical protein	
CC_3500	3,954	3,937	3,736	TonB-dependent receptor	
Sekretion					
CC_0603	1,530	1,616	1,501	hypothetical protein	
Transkription					
CC_0051	1,415	1,536	1,001	transcriptional regulator, Cro/CI family	
CC_0157	1,013	1,580	1,658	transcriptional regulator, ArsR family	
CC_0513	1,150	1,808	1,190	hypothetical protein	
CC_0665	1,589	2,474	1,710	cold-shock domain family protein	A
CC_0962	2,095	3,031	2,190	histidine utilization repressor	
CC_1137	1,357	2,217	1,428	transcriptional regulator, LacI family	
CC_1489	1,200	2,108	2,062	transcriptional regulator, LacI family	
CC_1776	2,139	2,417	2,309	transcriptional regulator, GntR family	
CC_1779	1,634	1,427	2,160	ThiJ/PfpI family protein	
CC_1780	1,038	1,059	1,168	ThiJ/PfpI family protein	
CC_1786	1,472	2,155	1,919	transcriptional regulator, TetR family	
CC_2040	1,278	1,040	1,007	ATP-dependent RNA helicase, DEAD/DEAH family	
CC_2162	1,258	1,406	1,323	aminotransferase, class I	
CC_2330	1,071	1,633	1,357	transcriptional regulator, Cro/CI family	
CC_2517	1,622	1,999	1,666	transcriptional regulator, LysR family	
CC_2566	1,437	1,784	1,735	hypothetical protein	
CC_2608	1,544	1,770	1,856	transcriptional regulator, TetR family	
CC_2705	1,005	3,317	1,117	transcriptional regulator, Cro/CI family	A
CC_2771	1,954	2,926	2,402	transcriptional regulator, Cro/CI family	
CC_2969	1,189	1,383	1,730	hypothetical protein	
CC_3028	1,755	2,010	1,517	transcriptional regulator, ArsR family	
CC_3169	1,173	1,818	1,424	transcriptional regulator, AsnC family	
CC_3716	1,330	2,306	1,736	transcriptional regulator, TetR family	C
Translation					
CC_0037	1,169	1,875	3,406	ribosome-binding factor A	
CC_0769	1,082	2,658	3,663	ribosomal protein L34	A
CC_1046	1,323	1,690	3,474	50S ribosomal protein L35	
CC_1456	1,875	1,608	2,416	flagellin modification protein FlmH	
CC_1721	1,297	2,439	3,232	50S ribosomal protein L32	
CC_2205	1,809	1,980	1,567	glutamyl-Q tRNA(Asp) synthetase	
CC_2613	2,741	2,213	2,805	amidase	
CC_3397	1,579	2,233	1,161	ribosomal-protein-alanine acetyltransferase, putative	
Posttranslationale Modifikation/ Proteinabbau/ Chaperon					
CC_0686	2,141	1,029	3,576	co-chaperonin GroES	A
CC_1196	1,461	1,810	2,716	SsrA-binding protein	
CC_1476	1,258	1,857	3,055	hypothetical protein	C
CC_1885	1,517	1,658	1,453	leucyl/phenylalanyl-tRNA-protein transferase	

Fortsetzung auf nächster Seite

**Tabelle 5.5:** Fortsetzung: Gene mit verminderter Expression bei Kultivierung in M2G<sup>-P</sup>-Medium.

ID	1 h	2,5 h	6 h	Produkt	Bemerkung
CC_1997	1,099	1,650	1,997	protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase	
CC_2309	1,600	1,027	1,300	glutathione S-transferase family protein	
CC_2502	1,245	1,131	1,844	peptidase M20/M25/M40 family protein	
CC_2617	3,106	1,792	1,157	chaperone XdhC, putative	
CC_2727	1,735	1,891	1,359	hypothetical protein	
CC_3159	1,083	1,201	1,726	hypothetical protein	
CC_3639	1,363	2,246	2,753	glutathione S-transferase family protein	
CC_3668	1,371	1,493	1,598	heme exporter protein A	
CC_3674	1,549	2,423	1,628	thiol:disulfide interchange protein CycY	
Replikation/ Rekombination/ Reparatur					
CC_0159	1,665	2,246	2,609	recombination protein F	
CC_1033	1,557	2,285	1,719	C-5 cytosine-specific DNA methylase	
CC_1283	1,350	1,453	1,050	recombination factor protein RarA	
CC_1665	2,138	3,430	2,292	replicative DNA helicase	
CC_1974	1,228	1,603	1,854	DNA topoisomerase IV subunit B	
CC_2201	1,577	1,512	1,314	DNA-3-methyladenine glycosylase, putative	
CC_3049	1,374	1,928	1,768	DNA primase	
CC_3365	1,159	1,785	3,067	ribonuclease HI	
CC_3371	1,025	2,473	2,968	DNA invertase, putative	C
CC_3465	1,195	1,740	1,590	ATP-dependent DNA helicase RecQ	
CC_3530	1,252	1,712	1,997	hypothetical protein	
CC_3751	1,768	1,340	1,312	DNA polymerase III subunit delta	
Signaltransduktion					
CC_0934	1,120	1,546	1,343	sensor histidine kinase/response regulator	
CC_1553	1,308	1,861	1,063	guanosine-3',5'-bis(diphosphate) 3'-pyrophosphohydrolase	
CC_1742	1,171	2,064	1,459	nitrogen regulation protein NtrY	
CC_2344	1,963	2,256	1,527	phosphotyrosine protein phosphatase	
CC_2482	2,467	3,216	2,680	non-motile and phage-resistance protein	
Zellzykluskontrolle/ Zellteilung/ Chromosomensegregation					
CC_2005	1,568	1,903	2,093	segregation and condensation protein A	
CC_3755	1,299	1,676	1,535	tRNA uridine 5-carboxymethylaminomethyl modification enzyme GidA	
Unbekannte Funktion					
CC_0046	1,262	2,449	3,959	hypothetical protein	C
CC_0236	1,128	2,644	1,263	hypothetical protein	
CC_0406	1,257	1,174	1,091	hypothetical protein	
CC_0480	1,455	2,400	1,691	hypothetical protein	
CC_0523	1,961	3,064	1,788	hypothetical protein	
CC_0604	2,318	3,898	3,390	hypothetical protein	A, B
CC_0646	1,444	1,595	1,586	hypothetical protein	
CC_0671	1,321	1,177	1,529	hypothetical protein	
CC_0719	2,452	2,476	2,009	hypothetical protein	A
CC_0731	2,051	1,108	1,831	hypothetical protein	
CC_0765	2,580	3,140	3,703	hypothetical protein	C
CC_0802	1,240	1,915	1,158	hypothetical protein	
CC_0956	1,408	2,174	1,079	hypothetical protein	
CC_0973	1,184	1,709	1,083	hypothetical protein	
CC_0990	1,950	3,646	1,418	hypothetical protein	B
CC_1109	1,656	1,682	1,516	hypothetical protein	
CC_1174	1,161	1,715	1,231	hypothetical protein	
CC_1303	1,533	1,781	1,153	hypothetical protein	
CC_1313	1,061	1,558	2,037	hypothetical protein	
CC_1373	1,704	4,692	4,420	hypothetical protein	A, C, D, F

Fortsetzung auf nächster Seite

**Tabelle 5.5:** Fortsetzung: Gene mit verminderter Expression bei Kultivierung in M2G<sup>-P</sup>-Medium.

ID	1 h	2,5 h	6 h	Produkt	Bemerkung	
CC_1394	2,359	2,465	3,348	hypothetical protein	C	
CC_1519	1,042	1,135	1,149	hypothetical protein		
CC_1590	1,386	2,580	1,908	hypothetical protein		
CC_1694	1,513	1,794	1,117	hypothetical protein		
CC_1834	1,321	1,562	1,185	hypothetical protein		
CC_1891	1,988	2,116	1,316	pentapeptide repeat family protein		
CC_2078	1,302	1,496	1,433	hypothetical protein		
CC_2115	1,401	1,819	1,073	hypothetical protein		
CC_2280	1,148	2,063	2,241	hypothetical protein		
CC_2340	1,514	2,154	2,108	hypothetical protein		
CC_2606	3,084	3,591	3,014	hypothetical protein	C	
CC_2612	1,968	1,796	2,050	hypothetical protein		
CC_2614	2,785	2,891	2,914	hypothetical protein		
CC_2620	2,702	2,805	2,881	hypothetical protein		
CC_2621	2,310	2,289	1,440	hypothetical protein		
CC_2717	2,429	2,358	1,639	hypothetical protein		
CC_2723	2,117	1,673	1,250	hypothetical protein		
CC_2770	1,050	1,655	1,461	hypothetical protein		
CC_2855	1,300	1,897	1,150	hypothetical protein		
CC_2858	1,327	2,478	1,080	hypothetical protein		
CC_2904	2,703	3,323	4,271	hypothetical protein	C	
CC_3039	1,480	1,613	2,398	hypothetical protein		
CC_3101	1,817	2,859	1,995	hypothetical protein		
CC_3166	1,478	1,472	1,800	hypothetical protein		
CC_3193	1,192	2,031	1,287	hypothetical protein		
CC_3438	2,057	2,020	2,372	hypothetical protein		
CC_3452	1,717	2,072	1,602	hypothetical protein		
CC_3479	2,345	3,435	1,886	hypothetical protein		
CC_3493	1,024	1,432	1,380	hypothetical protein		
CC_3503	2,100	1,426	1,649	SCO1/2 family protein		
CC_3531	1,093	1,812	2,394	hypothetical protein	C	
CC_3532	1,507	1,865	1,021	hypothetical protein		
CC_3676	1,897	3,125	2,186	hypothetical protein		
kleine RNAs						
CC0266_CC0267	3,194	3,825	2,111			
CC0680_CC0681	1,141	1,882	1,347			



**Tabelle 5.6:** Gene mit verstärkter Expression in einem  $\Delta$ pstS-Stamm. Die Gene sind nach COG-Klassifizierung geordnet und die Regulation als log<sub>2</sub>Ratio angegeben. Bemerkungen: A - Regulation abhängig von PhoB, B - besitzt mögliche Pho-Box

ID	log <sub>2</sub> Ratio	Produkt	Bemerkung
Aminosäuremetabolismus			
CC_0581	1,412	arginine N-succinyltransferase	
CC_0583	4,162	succinylarginine dihydrolase	
CC_0584	3,871	succinylornithine transaminase, putative	
CC_0936	1,353	prolyl oligopeptidase family protein	
CC_0939	1,844	isopenicillin N epimerase, putative	A
CC_1278	1,800	GMC family oxidoreductase	
CC_1924	5,409	phosphoserine phosphatase	A
CC_1986	1,026	prolyl oligopeptidase family protein	
CC_3130	1,940	glutamine synthetase family protein	
CC_3168	1,566	methionine gamma-lyase	
CC_3688	1,085	prolyl oligopeptidase family protein	
Kohlenhydratmetabolismus			
CC_1385	2,195	fructose-1,6-bisphosphatase	
Coenzymmetabolismus			
CC_0885	2,493	riboflavin biosynthesis protein RibD	
CC_0886	3,036	riboflavin synthase subunit alpha	
CC_0887	4,382	3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase/GTP cyclohydrolase II	
CC_0888	2,670	riboflavin synthase, beta subunit	
Energistoffwechsel			
CC_0096	1,388	alcohol dehydrogenase, zinc-containing	
CC_0582	2,236	succinylglutamic semialdehyde dehydrogenase	
CC_0763	1,270	cytochrome d ubiquinol oxidase subunit II	
CC_3172	6,620	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase, putative	A
CC_3272	2,706	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	A
CC_3759	1,905	quinone oxidoreductase	
Lipidmetabolismus			
CC_0510	1,636	acetyl-CoA acetyltransferase	
CC_0511	1,964	acetoacetyl-CoA reductase	
CC_1110	1,427	acyl-CoA dehydrogenase family protein	
CC_1295	2,804	3-phytase, fusion, putative	A
CC_3441	1,423	arylesterase-related protein	
Nukleotidmetabolismus			
CC_0544	3,832	nuclease, putative	A
Sekundärmetabolismus			
CC_0478	1,283	dienelactone hydrolase, putative	
CC_2358	2,022	dienelactone hydrolase family protein	
CC_2531	1,296	fumarylacetoacetate hydrolase family protein	
CC_2532	1,701	homogentisate 1,2-dioxygenase	
CC_2672	1,418	Xaa-Pro dipeptidase, putative	
CC_3758	1,792	carboxymethylenebutenolidase	
Zellwand/ Membranbiogenese			
CC_0351	1,323	MltA-interacting MipA family protein	
CC_0756	4,723	glycosyl transferase, group 1 family protein	A
CC_1695	1,895	CsgG superfamily protein	
CC_1701	1,642	DedA family protein	
CC_1873	1,650	BacA	
CC_1958	2,547	glycosyl transferase, group 1 family protein	
CC_2601	2,185	hypothetical protein	

Fortsetzung auf nächster Seite

**Tabelle 5.6:** Fortsetzung: Gene mit verstärkter Expression in einem  $\Delta pstS$ -Stamm im Vergleich zum Wildtyp.

ID	log <sub>2</sub> Ratio	Produkt	Bemerkung
CC_3031	3,481	phospholipase C	A
CC_3229	1,017	OmpA family protein	
CC_3637	1,100	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	
Motilität/ Chemotaxis			
CC_0845	1,451	methyl-accepting chemotaxis sensory transducer, putative	
CC_2839	1,918	flgE-related flagellar hook protein	
CC_3349	2,162	methyl-accepting chemotaxis protein McpH	
Abwehr			
CC_0838	1,262	ABC transporter, ATP-binding protein	
CC_2200	2,605	HNH endonuclease family protein	A, B
Transport und Metabolismus von Ionen			
CC_0210	1,609	TonB-dependent receptor	
CC_0290	1,760	phosphate ABC transporter, permease protein PstC	
CC_0291	1,905	phosphate ABC transporter, permease protein PstA	
CC_0292	1,902	phosphate transporter ATP-binding protein PstB	
CC_0293	2,499	phosphate transport regulon regulator PhoU	
CC_0454	4,892	TonB-dependent receptor	A, B
CC_0455	4,170	alkaline phosphatase, putative	A
CC_0560	2,061	transcriptional regulator, putative	
CC_0562	2,020	TonB-dependent receptor	A
CC_0563	6,511	TonB-dependent receptor	
CC_0722	4,561	TonB-dependent receptor	A, B
CC_0737	3,975	Rieske 2Fe-2S family protein	A
CC_0995	4,078	TonB-dependent receptor, putative	A, B
CC_1097	1,084	chromate transporter, putative	
CC_1113	3,300	TonB-dependent receptor	A
CC_1565	2,126	alkaline phosphatase D	A
CC_1710	1,435	polyphosphate kinase	
CC_2149	5,311	TonB-dependent receptor	A
CC_2660	1,598	TonB-dependent receptor	
CC_2924	7,941	TonB-dependent receptor	A
CC_3147	1,283	TonB-dependent receptor	
Sekretion			
CC_0170	3,899	hypothetical protein	A
CC_0171	5,006	TonB-dependent receptor	A
CC_0172	1,640	general secretion pathway protein C, putative	A
CC_0173	3,785	general secretion pathway protein D	A
CC_0174	4,723	general secretion pathway protein E	A
CC_0175	2,889	general secretion pathway protein F	A
CC_0176	3,369	general secretion pathway protein G	A
CC_0177	2,949	general secretion pathway protein H, putative	A
CC_0178	2,379	general secretion pathway protein I	A
CC_0179	2,981	general secretion pathway protein J	A
CC_0180	2,367	general secretion pathway protein K	A
CC_0181	2,994	general secretion pathway protein L, putative	A
CC_0182	1,502	general secretion pathway protein M, putative	A
CC_0183	2,726	general secretion pathway protein N, putative	A
Transkription			
CC_0561	1,030	sigma factor, putative	
CC_0884	2,153	transcriptional regulator, putative	
CC_1664	1,080	TetR family transcriptional regulator	
CC_3508	1,760	transcriptional regulator	
CC_3677	4,615	MarR family transcriptional regulator	A, B

Fortsetzung auf nächster Seite

**Tabelle 5.6:** Fortsetzung: Gene mit verstärkter Expression in einem  $\Delta pstS$ -Stamm im Vergleich zum Wildtyp.

ID	log <sub>2</sub> Ratio	Produkt	Bemerkung
Posttranslationale Modifikationen/ Proteinabbau/ Chaperon			
CC_0220	1,272	thiol-disulfide isomerase and thioredoxin	
Signaltransduktion			
CC_0026	1,692	sensory box histidine kinase/response regulator	
CC_0247	1,066	response regulator	
CC_0294	2,978	phosphate regulon response regulator PhoB	
CC_0896	3,213	GGDEF family protein	
CC_3094	3,469	sensory box/GGDEF family protein	A
Zellzykluskontrolle/ Zellteilung/ Chromosomensegregation			
CC_1537	1,515	ParA family protein	
Unbekannte Funktion			
CC_0167	1,891	transglutaminase family protein cysteine peptidase	
CC_0404	2,567	hypothetical protein	
CC_0517	2,020	hypothetical protein	
CC_0545	1,483	hypothetical protein	
CC_0550	1,226	hypothetical protein	
CC_0564	1,907	hypothetical protein	
CC_0692	1,964	hypothetical protein	
CC_0754	1,127	hypothetical protein	A
CC_0757	3,019	permease, putative	A
CC_0781	1,752	hypothetical protein	
CC_0834	1,108	hypothetical protein	
CC_0862	2,242	endonuclease/ exonuclease/ phosphatase, putative	A, B
CC_0996	4,130	hypothetical protein	A
CC_1000	1,849	SapC family protein	
CC_1037	1,147	hypothetical protein	
CC_1068	2,045	hypothetical protein	
CC_1112	3,324	metal-dependent hydrolase	A
CC_1132	1,954	phosphoesterase, putative	
CC_1202	1,341	hypothetical protein	
CC_1277	3,083	type I phosphodiesterase/nucleotide pyrophosphatase family protein	A
CC_1290	2,084	hypothetical protein	
CC_1375	2,226	phosphatase, putative	A, B
CC_1398	1,929	hypothetical protein	
CC_1462	1,055	hypothetical protein	
CC_1820	1,743	hypothetical protein	
CC_1978	1,432	hypothetical protein	
CC_2026	1,019	hypothetical protein	
CC_2119	3,891	YceI family protein	
CC_2225	3,576	hypothetical protein	A, B
CC_2257	1,138	S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase	
CC_2414	2,111	hypothetical protein	
CC_2415	1,565	hypothetical protein	
CC_2640	1,032	hypothetical protein	
CC_2925	3,467	acid phosphatase, putative	A, B
CC_2965	1,389	hypothetical protein	
CC_3329	1,209	hypothetical protein	A, B
CC_3339	1,715	hypothetical protein	
CC_3377	1,066	hypothetical protein	
CC_3419	1,926	hypothetical protein	
CC_3559	1,036	hypothetical protein	
CC_3571	2,059	alpha-2-macroglobulin domain-containing protein	
CC_3609	1,424	hypothetical protein	
CC_3658	1,452	hypothetical protein	

**Tabelle 5.7:** Gene mit verminderter Expression in einem  $\Delta pstS$ -Stamm im Vergleich zum Wildtyp. Die Gene sind nach COG-Klassifizierung geordnet und die Regulation als  $\log_2$ Ratio angegeben. Bemerkungen: A - Regulation abhängig von PhoB

ID	log <sub>2</sub> Ratio	Produkt	Bemerkung
Aminosäuremetabolismus			
CC_0456	4,203	amino acid transporter LysE	A
CC_0716	1,681	L-lysine 2,3-aminomutase, putative	
CC_0738	1,310	aspartate aminotransferase	
CC_1339	2,154	nitrogen regulatory protein P-II 2	
CC_1378	2,154	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	
CC_3093	1,436	threonine aldolase, low-specificity	
Kohlenhydratmetabolismus			
CC_0861	1,101	sugar ABC transporter, permease protein	
CC_3269	1,953	extragenic suppressor protein SuhB	
CC_2315	1,322	transporter, major facilitator superfamily	
CC_2286	1,417	alpha-amylase family protein	
CC_1103	1,069	sugar fucose permease family protein	
Coenzymmetabolismus			
CC_2912	1,015	quinolinate synthetase	
Energiestoffwechsel			
CC_1219	1,405	oxidoreductase, FAD-binding	
CC_3638	1,878	iron-sulfur-binding protein	
Lipidmetabolismus			
CC_1736	1,081	cyclase/dehydrase	
Nukleotidmetabolismus			
CC_1708	1,129	exopolyphosphatase	
Zellwand/ Membranbiogenese			
CC_1706	1,043	penicillin-binding protein	
CC_1925	1,936	methyltransferase	
CC_3173	1,157	glycosyl transferase, group 1 family protein	
Motilität/ Chemotaxis			
CC_0598	1,534	chemotaxis protein methyltransferase CheR	
CC_2691	1,064	methyl-accepting chemotaxis protein McpF, putative	
Transport und Metabolismus von Ionen			
CC_0214	1,296	TonB-dependent receptor	
CC_1338	1,604	ammonium transporter	
CC_2287	1,787	TonB-dependent receptor	
CC_3013	1,093	TonB-dependent receptor	
Transkription			
CC_0334	1,223	TetR family transcriptional regulator	
CC_1786	1,204	TetR family transcriptional regulator	
CC_2352	1,327	LysR family transcriptional regulator	
CC_2391	1,508	MarR family transcriptional regulator	
CC_3716	1,415	TetR family transcriptional regulator	
Translation			
CC_0721	1,355	elongation factor P	
Posttranslationale Modifikationen/ Proteinabbau/ Chaperon			
CC_1476	1,342	chaperone protein dnaK	
CC_2502	1,312	peptidase M20/M25/M40 family protein	

Fortsetzung auf nächster Seite

**Tabelle 5.7:** Fortsetzung: Gene mit verminderter Expression in einem  $\Delta pstS$ -Stamm im Vergleich zum Wildtyp.

ID	log <sub>2</sub> Ratio	Produkt	Bemerkung
Replikation/ Rekombination/ Reparatur			
CC_0642	1,441	ISCC2, transposase	
CC_1206	2,223	ISCC1, transposase OrfB	
CC_3371	1,057	DNA invertase, putative	
Signaltransduktion			
CC_2735	1,531	HipA-related phosphatidylinositol 3/4-kinase	
Unbekannte Funktion			
CC_0046	1,387	hypothetical protein	
CC_0048	1,095	hypothetical protein	
CC_0083	1,284	hypothetical protein	
CC_0149	1,468	hypothetical protein	
CC_0287	1,723	hypothetical protein	
CC_0619	2,270	hypothetical protein	
CC_0749	2,468	hypothetical protein	
CC_0765	2,450	hypothetical protein	
CC_1312	1,858	hypothetical protein	
CC_1349	2,437	hypothetical protein	
CC_1373	3,924	hypothetical protein	A
CC_1414	2,782	hypothetical protein	
CC_1506	2,804	arsenical resistance protein ArsH, putative	
CC_1590	2,598	hypothetical protein	
CC_1717	2,492	hypothetical protein	
CC_2017	1,239	hypothetical protein	
CC_2046	2,429	hypothetical protein	
CC_2271	2,304	phosphohydrolase, MutT/nudix family protein	
CC_2293	1,409	hypothetical protein	
CC_2322	1,258	NUDIX hydrolase, putative	
CC_2334	1,019	hypothetical protein	
CC_2424	1,969	transposase/integrase-related peptide	
CC_2658	1,905	hypothetical protein	
CC_2692	3,599	hypothetical protein	
CC_2693	3,783	hypothetical protein	
CC_2730	2,082	Ice nucleation protein	
CC_2904	1,645	hypothetical protein	
CC_2906	1,008	hypothetical protein	
CC_3026	2,721	hypothetical protein	
CC_3171	2,056	hypothetical protein	
CC_3438	1,820	hypothetical protein	
CC_3493	1,561	hypothetical protein	
CC_3520	2,083	hypothetical protein	
CC_3546	1,138	Usg protein	
CC_3676	2,253	hypothetical protein	
kleine RNAs			
CC0641_CC0642	1,329		
CC0661_CC0662	2,280		
CC0680_CC0681	2,955		
CC0681_CC0682	4,558		
CC2922_CC2923	1,696		

## 5.3 Matrix für die Suche nach Pho-Boxen mittels FIMO

```
MEME version 4.4.0

ALPHABET= ACGT

strands: + -

MOTIF pho

BL MOTIF crp width=18 seqs=1

letter-probability matrix: alength= 4 w= 18 nsites= 5

0.000000  0.800000  0.000000  0.200000
0.000000  0.200000  0.000000  0.800000
0.000000  0.000000  1.000000  0.000000
0.000000  0.200000  0.000000  0.800000
0.000000  1.000000  0.000000  0.000000
0.400000  0.000000  0.400000  0.200000
0.000000  0.000000  0.000000  1.000000
0.174000  0.326000  0.326000  0.174000
0.174000  0.326000  0.326000  0.174000
0.174000  0.326000  0.326000  0.174000
0.174000  0.326000  0.326000  0.174000
0.000000  0.800000  0.000000  0.200000
0.000000  0.000000  0.000000  1.000000
0.000000  0.000000  1.000000  0.000000
0.000000  0.000000  0.200000  0.800000
0.000000  0.800000  0.200000  0.000000
0.600000  0.000000  0.400000  0.000000
0.000000  0.600000  0.000000  0.400000
```



# Literaturverzeichnis

- [1] M. Aaron, G. Charbon, H. Lam, H. Schwarz, W. Vollmer, and C. Jacobs-Wagner (2007) The tubulin homologue FtsZ contributes to cell elongation by guiding cell wall precursor synthesis in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol*, 64:938–52.
- [2] D. W. Adams and J. Errington (2009) Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nat Rev Microbiol*, 7:642–53.
- [3] P. Aldridge, R. Paul, P. Goymer, P. Rainey, and U. Jenal (2003) Role of the GGDEF regulator PleD in polar development of *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol*, 47:1695–708.
- [4] M. N. Alekshun, S. B. Levy, T. R. Mealy, B. A. Seaton, and J. F. Head (2001) The crystal structure of MarR, a regulator of multiple antibiotic resistance, at 2.3 Å resolution. *Nat Struct Biol*, 8:710–4.
- [5] N. E. Allenby, N. O'Connor, Z. Pragai, A. C. Ward, A. Wipat, and C. R. Harwood (2005) Genome-wide transcriptional analysis of the phosphate starvation stimulon of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 187:8063–80.
- [6] S. A. Alyahya, R. Alexander, T. Costa, A. O. Henriques, T. Emonet, and C. Jacobs-Wagner (2009) RodZ, a component of the bacterial core morphogenic apparatus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106:1239–44.
- [7] H. Antelmann, C. Scharf, and M. Hecker (2000) Phosphate starvation-inducible proteins of *Bacillus subtilis*: proteomics and transcriptional analysis. *J Bacteriol*, 182:4478–90.
- [8] N. Ausmees, J. R. Kuhn, and C. Jacobs-Wagner (2003) The bacterial cytoskeleton: an intermediate filament-like function in cell shape. *Cell*, 115:705–13.
- [9] F. Ausubel, R. Brent, R. Kingston, D. Moore, J. Seidman, J. Smith, and K. Struhl (2002). Short protocols in molecular biology: A Compendium of methods from current protocols in molecular biology.
- [10] P. Awram and J. Smit (1998) The *Caulobacter crescentus* paracrystalline S-layer protein is secreted by an ABC transporter (type I) secretion apparatus. *J Bacteriol*, 180:3062–9.
- [11] M. M. Babu, M. L. Priya, A. T. Selvan, M. Madera, J. Gough, L. Aravind, and K. Sankaran (2006) A database of bacterial lipoproteins (DOLOP) with functional assignments to predicted lipoproteins. *J Bacteriol*, 188:2761–73.

- [12] J. H. Baek and S. Y. Lee (2006) Novel gene members in the Pho regulon of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*, 264:104–9.
- [13] S. Bagchi, H. Tomenius, L. M. Belova, and N. Ausmees (2008) Intermediate filament-like proteins in bacteria and a cytoskeletal function in *Streptomyces*. *Mol Microbiol*.
- [14] T. L. Bailey and C. Elkan (1994) Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*, 2:28–36.
- [15] H. Barreteau, A. Kovac, A. Boniface, M. Sova, S. Gobec, and D. Blanot (2008) Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev*, 32:168–207.
- [16] S. Ben-Yehuda, D. Z. Rudner, and R. Losick (2003) RacA, a bacterial protein that anchors chromosomes to the cell poles. *Science*, 299:532–6.
- [17] F. O. Bendezú, C. A. Hale, T. G. Bernhardt, and P. A. de Boer (2008) RodZ (YfgA) is required for proper assembly of the MreB actin cytoskeleton and cell shape in *E. coli*. *EMBO J*.
- [18] U. Bertsche, T. Kast, B. Wolf, C. Fraipont, M. E. Aarsman, K. Kannenberg, M. von Rechenberg, M. Nguyen-Disteche, T. den Blaauwen, J. V. Holtje, and W. Vollmer (2006) Interaction between two murein (peptidoglycan) synthases, PBP3 and PBP1B, in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 61:675–90.
- [19] E. F. Bi and J. Lutkenhaus (1991) FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature*, 354:161–4.
- [20] E. G. Biondi, S. J. Reisinger, J. M. Skerker, M. Arif, B. S. Perchuk, K. R. Ryan, and M. T. Laub (2006) Regulation of the bacterial cell cycle by an integrated genetic circuit. *Nature*, 444:899–904.
- [21] P. M. Blumberg and J. L. Strominger (1972) Five penicillin-binding components occur in *Bacillus subtilis* membranes. *J Biol Chem*, 247:8107–13.
- [22] G. R. Bowman, L. R. Comolli, J. Zhu, M. Eckart, M. Koenig, K. H. Downing, W. E. Moerner, T. Earnest, and L. Shapiro (2008) A polymeric protein anchors the chromosomal origin/ParB complex at a bacterial cell pole. *Cell*, 134:945–55.
- [23] D. Bramhill and C. M. Thompson (1994) GTP-dependent polymerization of *Escherichia coli* FtsZ protein to form tubules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91:5813–7.
- [24] A. Briegel, D. P. Dias, Z. Li, R. B. Jensen, A. S. Frangakis, and G. J. Jensen (2006) Multiple large filament bundles observed in *Caulobacter crescentus* by electron cryotomography. *Mol Microbiol*, 62:5–14.
- [25] N. Buddelmeijer, M. Krehenbrink, F. Pecorari, and A. P. Pugsley (2009) Type II secretion system secretin PulD localizes in clusters in the *Escherichia coli* outer membrane. *J Bacteriol*, 191:161–8.

- [26] A. C. Burchard, R. P. Burchard, and J. A. Kloetzel (1977) Intracellular, periodic structures in the gliding bacterium *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol*, 132:666–72.
- [27] M. T. Cabeen, G. Charbon, W. Vollmer, P. Born, N. Ausmees, D. B. Weibel, and C. Jacobs-Wagner (2009) Bacterial cell curvature through mechanical control of cell growth. *EMBO J*.
- [28] M. T. Cabeen and C. Jacobs-Wagner (2007) Skin and bones: the bacterial cytoskeleton, cell wall, and cell morphogenesis. *J Cell Biol*, 179:381–7.
- [29] R. Carballido-Lopez (2006) The bacterial actin-like cytoskeleton. *Microbiol Mol Biol Rev*, 70:888–909.
- [30] R. Carballido-Lopez and J. Errington (2003) The bacterial cytoskeleton: *in vivo* dynamics of the actin-like protein Mbl of *Bacillus subtilis*. *Dev Cell*, 4:19–28.
- [31] V. Chapon-Herve, M. Akrim, A. Latifi, P. Williams, A. Lazdunski, and M. Bally (1997) Regulation of the *xcp* secretion pathway by multiple quorum-sensing modulons in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*, 24:1169–78.
- [32] G. Charbon, M. T. Cabeen, and C. Jacobs-Wagner (2009) Bacterial intermediate filaments: *in vivo* assembly, organization, and dynamics of crescentin. *Genes Dev*, 23:1131–44.
- [33] I. Chen and D. Dubnau (2004) DNA uptake during bacterial transformation. *Nat Rev Microbiol*, 2:241–9.
- [34] S. E. Chuang, D. L. Daniels, and F. R. Blattner (1993) Global regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 175:2026–36.
- [35] N. P. Cianciotto (2005) Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *Trends Microbiol*, 13:581–8.
- [36] S. P. Cohen, H. Hachler, and S. B. Levy (1993) Genetic and functional analysis of the multiple antibiotic resistance (*mar*) locus in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 175:1484–92.
- [37] G. E. Crooks, G. Hon, J. M. Chandonia, and S. E. Brenner (2004) WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res*, 14:1188–90.
- [38] J. F. da Silva Neto, V. S. Braz, V. C. Italiani, and M. V. Marques (2009) Fur controls iron homeostasis and oxidative stress defense in the oligotrophic alpha-proteobacterium *Caulobacter crescentus*. *Nucleic Acids Res*, 37:4812–25.
- [39] P. de Boer, R. Crossley, and L. Rothfield (1992) The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase. *Nature*, 359:254–6.

- [40] S. DebRoy, J. Dao, M. Soderberg, O. Rossier, and N. P. Cianciotto (2006) *Legionella pneumophila* type II secretome reveals unique exoproteins and a chitinase that promotes bacterial persistence in the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103:19146–51.
- [41] H. J. Defeu Soufo and P. L. Graumann (2006) Dynamic localization and interaction with other *Bacillus subtilis* actin-like proteins are important for the function of MreB. *Mol Microbiol*, 62:1340–56.
- [42] T. den Blaauwen, M. A. de Pedro, M. Nguyen-Disteche, and J. A. Ayala (2008) Morphogenesis of rod-shaped sacculi. *FEMS Microbiol Rev*, 32:321–44.
- [43] C. d’Enfert, A. Ryter, and A. P. Pugsley (1987) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Klebsiella pneumoniae* genes for production, surface localization and secretion of the lipoprotein pullulanase. *EMBO J*, 6:3531–8.
- [44] M. Desvaux, N. J. Parham, A. Scott-Tucker, and I. R. Henderson (2004) The general secretory pathway: a general misnomer? *Trends Microbiol*, 12:306–9.
- [45] A. V. Divakaruni, C. Baida, C. L. White, and J. W. Gober (2007) The cell shape proteins MreB and MreC control cell morphogenesis by positioning cell wall synthetic complexes. *Mol Microbiol*, 66:174–88.
- [46] A. V. Divakaruni, R. R. Loo, Y. Xie, J. A. Loo, and J. W. Gober (2005) The cell-shape protein MreC interacts with extracytoplasmic proteins including cell wall assembly complexes in *Caulobacter crescentus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102:18602–7.
- [47] I. J. Domian, K. C. Quon, and L. Shapiro (1997) Cell type-specific phosphorylation and proteolysis of a transcriptional regulator controls the G1-to-S transition in a bacterial cell cycle. *Cell*, 90:415–24.
- [48] N. A. Dye, Z. Pincus, J. A. Theriot, L. Shapiro, and Z. Gitai (2005) Two independent spiral structures control cell shape in *Caulobacter*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102:18608–13.
- [49] G. Ebersbach, A. Briegel, G. J. Jensen, and C. Jacobs-Wagner (2008) A self-associating protein critical for chromosome attachment, division, and polar organization in *Caulobacter*. *Cell*, 134:956–68.
- [50] D. H. Edwards and J. Errington (1997) The *Bacillus subtilis* DivIVA protein targets to the division septum and controls the site specificity of cell division. *Mol Microbiol*, 24:905–15.
- [51] S. Eisenbeis, S. Lohmiller, M. Valdebenito, S. Leicht, and V. Braun (2008) NagA-dependent uptake of N-acetyl-glucosamine and N-acetyl-chitin oligosaccharides across the outer membrane of *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol*, 190:5230–8.
- [52] B. Ely (1991) Genetics of *Caulobacter crescentus*. *Methods Enzymol*, 204:372–384.

- 
- [53] B. Ely, T. W. Ely, J. Crymes, W. B., and S. A. Minnich (2000) A family of six flagellin genes contributes to the *Caulobacter crescentus* flagellar filament. *J Bacteriol*, 182:5001–4.
- [54] J. C. England, B. S. Perchuk, M. T. Laub, and J. W. Gober (2010) Global regulation of gene expression and cell differentiation in *Caulobacter crescentus* in response to nutrient availability. *J Bacteriol*, 192:819–33.
- [55] O. Esue, D. Wirtz, and Y. Tseng (2006) GTPase activity, structure, and mechanical properties of filaments assembled from bacterial cytoskeleton protein MreB. *J Bacteriol*, 188:968–76.
- [56] M. Evinger and N. Agabian (1977) Envelope-associated nucleoid from *Caulobacter crescentus* stalked and swarmer cells. *J Bacteriol*, 132:294–301.
- [57] R. M. Figge, A. V. Divakaruni, and J. W. Gober (2004) MreB, the cell shape-determining bacterial actin homologue, co-ordinates cell wall morphogenesis in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol*, 51:1321–32.
- [58] R. D. Finn, J. Tate, J. Mistry, P. C. Coghill, S. J. Sammut, H. R. Hotz, G. Ceric, K. Forslund, S. R. Eddy, E. L. Sonnhammer, and A. Bateman (2008) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res*, 36:D281–8.
- [59] K. Flårdh (2003) Essential role of DivIVA in polar growth and morphogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol*, 49:1523–36.
- [60] E. Frixione (2000) Recurring views on the structure and function of the cytoskeleton: a 300-year epic. *Cell Motil Cytoskeleton*, 46:73–94.
- [61] A. Frost, V. M. Unger, and P. De Camilli (2009) The BAR domain superfamily: membrane-molding macromolecules. *Cell*, 137:191–6.
- [62] R. C. Gayda, M. C. Henk, and D. Leong (1992) C-shaped cells caused by expression of an *ftsA* mutation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 174:5362–70.
- [63] Z. Gitai, N. Dye, and L. Shapiro (2004) An actin-like gene can determine cell polarity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101:8643–8.
- [64] Z. Gitai, N. A. Dye, A. Reisenauer, M. Wachi, and L. Shapiro (2005) MreB actin-mediated segregation of a specific region of a bacterial chromosome. *Cell*, 120:329–41.
- [65] N. W. Goehring and J. Beckwith (2005) Diverse paths to midcell: assembly of the bacterial cell division machinery. *Curr Biol*, 15:R514–26.
- [66] B. S. Goldman, W. C. Nierman, D. Kaiser, S. C. Slater, A. S. Durkin, J. A. Eisen, C. M. Ronning, W. B. Barbazuk, M. Blanchard, C. Field, C. Halling, G. Hinkle, O. Iartchuk,

- H. S. Kim, C. Mackenzie, R. Madupu, N. Miller, A. Shvartsbeyn, S. A. Sullivan, M. Vaudin, et al. (2006) Evolution of sensory complexity recorded in a myxobacterial genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103:15200–5.
- [67] E. D. Goley, A. A. Iniesta, and L. Shapiro (2007) Cell cycle regulation in *Caulobacter*: location, location, location. *J Cell Sci*, 120:3501–3507.
- [68] M. Gonin, E. M. Quardokus, D. O’Donnell, J. Maddock, and Y. V. Brun (2000) Regulation of stalk elongation by phosphate in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol*, 182:337–47.
- [69] C. Gram (1884) Über die isolierte Färbung der *Schizomyceten* in Schnitt- und Trockenpräparaten. *Fortschritte der Medizin*, 2:185–189.
- [70] P. L. Graumann (2007) Cytoskeletal elements in bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 61:589–618.
- [71] T. Gristwood, P. C. Fineran, L. Everson, N. R. Williamson, and G. P. Salmond (2009) The PhoBR two-component system regulates antibiotic biosynthesis in *Serratia* in response to phosphate. *BMC Microbiol*, 9:112.
- [72] R. Gu, S. Fonseca, L. G. Puskas, J. Hackler, L., A. Zvara, D. Dudits, and M. S. Pais (2004) Transcript identification and profiling during salt stress and recovery of *Populus euphratica*. *Tree Physiol*, 24:265–76.
- [73] L. M. Guzman, D. Belin, M. J. Carson, and J. Beckwith (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P<sub>BAD</sub> promoter. *J Bacteriol*, 177:4121–30.
- [74] F. Harada and S. Nishimura (1972) Possible anticodon sequences of tRNA<sup>His</sup>, tRNA<sup>Asm</sup>, and tRNA<sup>Asp</sup> from *Escherichia coli* B. Universal presence of nucleoside Q in the first position of the anticodons of these transfer ribonucleic acids. *Biochemistry*, 11:301–8.
- [75] N. A. Hay, D. J. Tipper, D. Gygi, and C. Hughes (1999) A novel membrane protein influencing cell shape and multicellular swarming of *Proteus mirabilis*. *J Bacteriol*, 181:2008–16.
- [76] A. M. Hempel, S. B. Wang, M. Letek, J. A. Gil, and K. Flärdh (2008) Assemblies of DivIVA mark sites for hyphal branching and can establish new zones of cell wall growth in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol*, 190:7579–83.
- [77] R. Hengge (2009) Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 7:263–73.
- [78] A. T. Henrici and D. E. Johnson (1935) Studies of Freshwater Bacteria: II. Stalked Bacteria, a New Order of *Schizomycetes*. *J Bacteriol*, 30:61–93.



- 
- [79] H. Herrmann and U. Aebi (2004) Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds. *Annu Rev Biochem*, 73:749–89.
- [80] J. V. Höltje (1998) Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62:181–203.
- [81] J. Hodgkin and D. Kaiser (1977) Cell-to-cell stimulation of movement in nonmotile mutants of *Myxococcus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74:2938–2942.
- [82] J. Hodgkin and D. Kaiser (1979) Genetics of gliding motility in *Myxococcus xanthus* (Myxobacterales): two gene systems control movement. *Mol Gen Genet*, 171:177–191.
- [83] A. K. Hottes, M. Meewan, D. Yang, N. Arana, P. Romero, H. H. McAdams, and C. Stephens (2004) Transcriptional profiling of *Caulobacter crescentus* during growth on complex and minimal media. *J Bacteriol*, 186:1448–61.
- [84] P. Hu, E. L. Brodie, Y. Suzuki, H. H. McAdams, and G. L. Andersen (2005) Whole-genome transcriptional analysis of heavy metal stresses in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol*, 187:8437–49.
- [85] Q. Hua, C. Yang, T. Oshima, H. Mori, and K. Shimizu (2004) Analysis of gene expression in *Escherichia coli* in response to changes of growth-limiting nutrient in chemostat cultures. *Appl Environ Microbiol*, 70:2354–66.
- [86] M. M. Ireland, J. A. Karty, E. M. Quardokus, J. P. Reilly, and Y. V. Brun (2002) Proteomic analysis of the *Caulobacter crescentus* stalk indicates competence for nutrient uptake. *Mol Microbiol*, 45:1029–41.
- [87] N. Iwai, K. Nagai, and M. Wachi (2002) Novel S-benzylisothiourea compound that induces spherical cells in *Escherichia coli* probably by acting on a rod-shape-determining protein(s) other than penicillin-binding protein 2. *Biosci Biotechnol Biochem*, 66:2658–62.
- [88] C. Jacobs, I. J. Domian, J. R. Maddock, and L. Shapiro (1999) Cell cycle-dependent polar localization of an essential bacterial histidine kinase that controls DNA replication and cell division. *Cell*, 97:111–20.
- [89] U. Jenal and L. Shapiro (1996) Cell cycle-controlled proteolysis of a flagellar motor protein that is asymmetrically distributed in the *Caulobacter* predivisional cell. *EMBO J*, 15:2393–406.
- [90] H. C. Jones and J. M. Schmidt (1973) Ultrastructural study of crossbands occurring in the stalks of *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol*, 116:466–70.
- [91] L. J. Jones, R. Carballido-Lopez, and J. Errington (2001) Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell*, 104:913–22.

- [92] S. S. Justice, D. A. Hunstad, L. Cegelski, and S. J. Hultgren (2008) Morphological plasticity as a bacterial survival strategy. *Nat Rev Microbiol*, 6:162–8.
- [93] J. Kahnt, B. Buchenau, F. Mahlert, M. Kruger, S. Shima, and R. K. Thauer (2007) Post-translational modifications in the active site region of methyl-coenzyme M reductase from methanogenic and methanotrophic archaea. *FEBS J*, 274:4913–21.
- [94] D. Kaiser (1979) Social gliding is correlated with the presence of pili in *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76:5952–6.
- [95] J. Kühn, A. Briegel, E. Mörschel, J. Kahnt, K. Leser, S. Wick, G. J. Jensen, and M. Thanbichler (2010) Bactofilins, a ubiquitous class of cytoskeletal proteins mediating polar localization of a cell wall synthase in *Caulobacter crescentus*. *EMBO J*, 29:327–39.
- [96] R. Koebnik, K. P. Locher, and P. Van Gelder (2000) Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol*, 37:239–53.
- [97] S. Koyasu, A. Fukuda, and Y. Okada (1980) The penicillin-binding proteins of *Caulobacter crescentus*. *J Biochem*, 87:363–6.
- [98] T. Kruse, J. Bork-Jensen, and K. Gerdes (2005) The morphogenetic MreBCD proteins of *Escherichia coli* form an essential membrane-bound complex. *Mol Microbiol*, 55:78–89.
- [99] M. J. Kuehn and N. C. Kesty (2005) Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev*, 19:2645–55.
- [100] I. Kulaev, V. Vagabov, and T. Kulakovskaya (1999) New aspects of inorganic polyphosphate metabolism and function. *J Biosci Bioeng*, 88:111–29.
- [101] U. K. Laemmli (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680–5.
- [102] H. Lam, W. B. Schofield, and C. Jacobs-Wagner (2006) A landmark protein essential for establishing and perpetuating the polarity of a bacterial cell. *Cell*, 124:1011–23.
- [103] S. G. Landt, E. Abeliuk, P. T. McGrath, J. A. Lesley, H. H. McAdams, and L. Shapiro (2008) Small non-coding RNAs in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol*.
- [104] J. Lassak, A. L. Henche, L. Binnenkade, and K. M. Thormann (2010) ArcS is the cognate sensor kinase in an atypical Arc system of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Appl Environ Microbiol*, 76:3263–74.
- [105] M. T. Laub, H. H. McAdams, T. Feldblyum, C. M. Fraser, and L. Shapiro (2000) Global analysis of the genetic network controlling a bacterial cell cycle. *Science*, 290:2144–8.
- [106] S. H. Lee, D. L. Hava, M. K. Waldor, and A. Camilli (1999) Regulation and temporal expression patterns of *Vibrio cholerae* virulence genes during infection. *Cell*, 99:625–34.

- 
- [107] R. Lenarcic, S. Halbedel, L. Visser, M. Shaw, L. J. Wu, J. Errington, D. Marenduzzo, and L. W. Hamoen (2009) Localisation of DivIVA by targeting to negatively curved membranes. *EMBO J*, 28:2272–2282.
- [108] J. A. Lesley and L. Shapiro (2008) SpoT regulates DnaA stability and initiation of DNA replication in carbon-starved *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol*, 190:6867–80.
- [109] M. Letek, E. Ordonez, J. Vaquera, W. Margolin, K. Flärdh, L. M. Mateos, and J. A. Gil (2008) DivIVA is required for polar growth in the MreB-lacking rod-shaped actinomycete *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol*, 190:3283–92.
- [110] I. Letunic and P. Bork (2007) Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics*, 23:127–8. Letunic, Ivica Bork, Peer England Bioinformatics (Oxford, England) Bioinformatics. 2007 Jan 1;23(1):127-8. Epub 2006 Oct 18.
- [111] X. Li, D. A. Rasko, C. V. Lokatell, D. E. Johnson, and H. L. Mobley (2001) Repression of bacterial motility by a novel fimbrial gene product. *EMBO J*, 20:4854–62.
- [112] Z. Li, M. J. Trimble, Y. V. Brun, and G. J. Jensen (2007) The structure of FtsZ filaments *in vivo* suggests a force-generating role in cell division. *EMBO J*, 26:4694–708.
- [113] M. Lindeberg and A. Collmer (1992) Analysis of eight out genes in a cluster required for pectic enzyme secretion by *Erwinia chrysanthemi*: sequence comparison with secretion genes from other gram-negative bacteria. *J Bacteriol*, 174:7385–97.
- [114] M. M. Lleo, P. Canepari, and G. Satta (1990) Bacterial cell shape regulation: testing of additional predictions unique to the two-competing-sites model for peptidoglycan assembly and isolation of conditional rod-shaped mutants from some wild-type cocci. *J Bacteriol*, 172:3758–71.
- [115] S. Lohmiller, K. Hantke, S. I. Patzer, and V. Braun (2008) TonB-dependent maltose transport by *Caulobacter crescentus*. *Microbiology*, 154:1748–54.
- [116] C. Lu, M. Reedy, and H. P. Erickson (2000) Straight and curved conformations of FtsZ are regulated by GTP hydrolysis. *J Bacteriol*, 182:164–70.
- [117] K. Makino, M. Amemura, S. K. Kim, A. Nakata, and H. Shinagawa (1993) Role of the sigma 70 subunit of RNA polymerase in transcriptional activation by activator protein PhoB in *Escherichia coli*. *Genes Dev*, 7:149–60.
- [118] K. Makino, H. Shinagawa, M. Amemura, S. Kimura, A. Nakata, and A. Ishihama (1988) Regulation of the phosphate regulon of *Escherichia coli*: Activation of *pstS* transcription by PhoB protein *in vitro*. *J Mol Biol*, 203:85–95.
- [119] L. M. Mashburn-Warren and M. Whiteley (2006) Special delivery: vesicle trafficking in prokaryotes. *Mol Microbiol*, 61:839–46.

- [120] H. Matsuzawa, S. Asoh, K. Kunai, K. Muraiso, A. Takasuga, and T. Ohta (1989) Nucleotide sequence of the *rodA* gene, responsible for the rod shape of *Escherichia coli*: *rodA* and the *pbpA* gene, encoding penicillin-binding protein 2, constitute the *rodA* operon. *J Bacteriol*, 171:558–60.
- [121] A. C. Meisenzahl, L. Shapiro, and U. Jenal (1997) Isolation and characterization of a xylose-dependent promoter from *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol*, 179:592–600.
- [122] A. Möll and M. Thanbichler (2009) FtsN-like proteins are conserved components of the cell division machinery in proteobacteria. *Mol Microbiol*, 72:1037–53.
- [123] T. Mohammadi, A. Karczmarek, M. Crouvoisier, A. Bouhss, D. Mengin-Lecreulx, and T. den Blaauwen (2007) The essential peptidoglycan glycosyltransferase MurG forms a complex with proteins involved in lateral envelope growth as well as with proteins involved in cell division in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 65:1106–21.
- [124] M. P. Molloy (2008) Isolation of bacterial cell membranes proteins using carbonate extraction. *Methods Mol Biol*, 424:397–401.
- [125] R. D. Monds, P. D. Newell, J. A. Schwartzman, and G. A. O’Toole (2006) Conservation of the Pho regulon in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Appl Environ Microbiol*, 72:1910–24.
- [126] A. Mukherjee and J. Lutkenhaus (1998) Dynamic assembly of FtsZ regulated by GTP hydrolysis. *EMBO J*, 17:462–9.
- [127] W. C. Nierman, D. DeShazer, H. S. Kim, H. Tettelin, K. E. Nelson, T. Feldblyum, R. L. Ulrich, C. M. Ronning, L. M. Brinkac, S. C. Daugherty, T. D. Davidsen, R. T. Deboy, G. Dimitrov, R. J. Dodson, A. S. Durkin, M. L. Gwinn, D. H. Haft, H. Khouri, J. F. Kolonay, R. Madupu, et al. (2004) Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101:14246–51.
- [128] W. C. Nierman, T. V. Feldblyum, M. T. Laub, I. T. Paulsen, K. E. Nelson, J. A. Eisen, J. F. Heidelberg, M. R. Alley, N. Ohta, J. R. Maddock, I. Potocka, W. C. Nelson, A. Newton, C. Stephens, N. D. Phadke, B. Ely, R. T. DeBoy, R. J. Dodson, A. S. Durkin, M. L. Gwinn, et al. (2001) Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98:4136–41.
- [129] M. Osawa, D. E. Anderson, and H. P. Erickson (2008) Reconstitution of contractile FtsZ rings in liposomes. *Science*, 320:792–4.
- [130] H. Paerl (1982) Factors limiting productivity of freshwater ecosystems. *Adv. Microb. Ecol*, 6:75–110.
- [131] R. J. Penfold and J. M. Pemberton (1992) An improved suicide vector for construction of chromosomal insertion mutations in bacteria. *Gene*, 118:145–6.

- [132] J. Pogliano (2008) The bacterial cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*, 20:19–27.
- [133] J. Poindexter (1984) Role of prostheca development in oligotrophic aquatic bacteria. *Curr perspect microb ecol. ASM Press*, 33–40.
- [134] J. S. Poindexter (1964) Biological Properties and Classification of the *Caulobacter* Group. *Bacteriol Rev*, 28:231–95.
- [135] J. S. Poindexter (2006) Dimorphic prosthecate bacteria: the genera *Caulobacter*, *Asticcacaulis*, *Hyphomicrobium*, *Pedomicrobium*, *Hyphomonas*, and *Thiodendron*. *The Prokaryotes*, 5:72–90.
- [136] J. S. Poindexter and J. G. Hagenzieker (1982) Novel peptidoglycans in *Caulobacter* and *Asticcacaulis* spp. *J Bacteriol*, 150:332–47.
- [137] J. S. Poindexter and J. T. Staley (1996) *Caulobacter* and *Asticcacaulis* stalk bands as indicators of stalk age. *J Bacteriol*, 178:3939–48.
- [138] E. M. Quardokus, N. Din, and Y. V. Brun (2001) Cell cycle and positional constraints on FtsZ localization and the initiation of cell division in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol*, 39:949–59.
- [139] K. C. Quon, B. Yang, I. J. Domian, L. Shapiro, and G. T. Marczynski (1998) Negative control of bacterial DNA replication by a cell cycle regulatory protein that binds at the chromosome origin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95:120–5.
- [140] S. K. Radhakrishnan, M. Thanbichler, and P. H. Viollier (2008) The dynamic interplay between a cell fate determinant and a lysozyme homolog drives the asymmetric division cycle of *Caulobacter crescentus*. *Genes Dev.*, 22:212–225.
- [141] G. Raghava (2002) APSSP2: A combination method for protein secondary structure prediction based on neural network and example based learning. *CASP5. A-132*.
- [142] S. V. Rajagopala, B. Titz, J. Goll, J. R. Parrish, K. Wohlbold, M. T. McKevitt, T. Palzkill, H. Mori, J. Finley, R. L., and P. Uetz (2007) The protein network of bacterial motility. *Mol Syst Biol*, 3:128.
- [143] K. S. Ramamurthi and R. Losick (2009) Negative membrane curvature as a cue for subcellular localization of a bacterial protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106:13541–5.
- [144] J. L. Ramos, M. Martinez-Bueno, A. J. Molina-Henares, W. Teran, K. Watanabe, X. Zhang, M. T. Gallegos, R. Brennan, and R. Tobes (2005) The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol Mol Biol Rev*, 69:326–56.
- [145] N. N. Rao and A. Torriani (1990) Molecular aspects of phosphate transport in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 4:1083–90.

- [146] M. S. Rappé, S. A. Connon, K. L. Vergin, and S. J. Giovannoni (2002) Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature*, 418:630–3.
- [147] D. RayChaudhuri and J. T. Park (1992) *Escherichia coli* cell-division gene *ftsZ* encodes a novel GTP-binding protein. *Nature*, 359:251–4.
- [148] M. Reddy (2007) Role of FtsEX in cell division of *Escherichia coli*: viability of *ftsEX* mutants is dependent on functional SufI or high osmotic strength. *J Bacteriol*, 189:98–108.
- [149] M. Russel (1998) Macromolecular assembly and secretion across the bacterial cell envelope: type II protein secretion systems. *J Mol Biol*, 279:485–99.
- [150] K. R. Ryan, J. A. Taylor, and L. M. Bowers (2010) The BAM complex subunit BamE (SmpA) is required for membrane integrity, stalk growth and normal levels of outer membrane beta-barrel proteins in *Caulobacter crescentus*. *Microbiology*, 156:742–56.
- [151] J. Sambrook, E. Fritsch, and T. Maniatis (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- [152] M. Sandkvist (2001) Biology of type II secretion. *Mol Microbiol*, 40:271–83.
- [153] M. Sandkvist (2001) Type II secretion and pathogenesis. *Infect Immun*, 69:3523–35.
- [154] P. M. Santos, I. Di Bartolo, J. M. Blatny, E. Zennaro, and S. Valla (2001) New broad-host-range promoter probe vectors based on the plasmid RK2 replicon. *FEMS Microbiol Lett*, 195:91–6.
- [155] J. M. Schmidt and R. Y. Stanier (1966) The development of cellular stalks in bacteria. *J Cell Biol*, 28:423–36.
- [156] H. N. Schulz and B. B. Jorgensen (2001) Big bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 55:105–37.
- [157] M. E. Scott, Z. Y. Dossani, and M. Sandkvist (2001) Directed polar secretion of protease from single cells of *Vibrio cholerae* via the type II secretion pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98:13978–83.
- [158] D. Shiomi, M. Sakai, and H. Niki (2008) Determination of bacterial rod shape by a novel cytoskeletal membrane protein. *EMBO J*, 27:3081–91.
- [159] J. M. Skerker and M. T. Laub (2004) Cell-cycle progression and the generation of asymmetry in *Caulobacter crescentus*. *Nat Rev Microbiol*, 2:325–337.
- [160] J. M. Skerker, M. S. Prasol, B. S. Perchuk, E. G. Biondi, and M. T. Laub (2005) Two-component signal transduction pathways regulating growth and cell cycle progression in a bacterium: a system-level analysis. *PLoS Biol*, 3:e334.



- [161] L. Sogaard-Andersen (2004) Cell polarity, intercellular signalling and morphogenetic cell movements in *Myxococcus xanthus*. *Curr Opin Microbiol*, 7:587–93.
- [162] B. G. Spratt and A. B. Pardee (1975) Penicillin-binding proteins and cell shape in *E. coli*. *Nature*, 254:516–7.
- [163] H. Stahlberg, E. Kutejova, K. Muchova, M. Gregorini, A. Lustig, S. A. Muller, V. Oliveri, A. Engel, A. J. Wilkinson, and I. Barak (2004) Oligomeric structure of the *Bacillus subtilis* cell division protein DivIVA determined by transmission electron microscopy. *Mol Microbiol*, 52:1281–90.
- [164] M. R. Stapleton, V. A. Norte, R. C. Read, and J. Green (2002) Interaction of the *Salmonella typhimurium* transcription and virulence factor SlyA with target DNA and identification of members of the SlyA regulon. *J Biol Chem*, 277:17630–7.
- [165] C. R. Stewart, O. Rossier, and N. P. Cianciotto (2009) Surface translocation by *Legionella pneumophila*: a form of sliding motility that is dependent upon type II protein secretion. *J Bacteriol*, 191:1537–46.
- [166] J. Stove and R. Stanier (1962) Cellular differentiation in stalked bacteria. *Nature*, 196:1189–1192.
- [167] M. L. Summers, J. G. Elkins, B. A. Elliott, and T. R. McDermott (1998) Expression and regulation of phosphate stress inducible genes in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Plant Microbe Interact*, 11:1094–101.
- [168] L. K. Sycuro, Z. Pincus, K. D. Gutierrez, J. Biboy, C. A. Stern, W. Vollmer, and N. R. Salama (2010) Peptidoglycan Crosslinking Relaxation Promotes *Helicobacter pylori*’s Helical Shape and Stomach Colonization. *Cell*, 141:822–833.
- [169] C. N. Takacs, S. Poggio, G. Charbon, M. Pucheault, W. Vollmer, and C. Jacobs-Wagner (2010) MreB drives *de novo* rod morphogenesis in *Caulobacter crescentus* via remodeling of the cell wall. *J Bacteriol*, 192:1671–84.
- [170] M. Thanbichler, A. A. Iniesta, and L. Shapiro (2007) A comprehensive set of plasmids for vanillate- and xylose-inducible gene expression in *Caulobacter crescentus*. *Nucleic Acids Res*, 35:–.
- [171] M. Thanbichler and L. Shapiro (2008) Getting organized - how bacterial cells move proteins and DNA. *Nat Rev Microbiol*, 6:28–40.
- [172] S. Thanedar and W. Margolin (2004) FtsZ exhibits rapid movement and oscillation waves in helix-like patterns in *Escherichia coli*. *Curr Biol*, 14:1167–73.
- [173] A. Torriani (1960) Influence of Inorganic Phosphate in the Formation of Phosphatases by *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, 38:460–469.

- [174] P. H. Tsang, G. Li, Y. V. Brun, L. B. Freund, and J. X. Tang (2006) Adhesion of single bacterial cells in the micronewton range. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103:5764–8.
- [175] T. Ueki, S. Inouye, and M. Inouye (1996) Positive-negative KG cassettes for construction of multi-gene deletions using a single drug marker. *Gene*, 183:153–7.
- [176] R. A. VanBogelen, E. R. Olson, B. L. Wanner, and F. C. Neidhardt (1996) Global analysis of proteins synthesized during phosphorus restriction in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 178:4344–66.
- [177] A. Varma, M. A. de Pedro, and K. D. Young (2007) FtsZ directs a second mode of peptidoglycan synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 189:5692–704.
- [178] A. Varma and K. D. Young (2009) In *Escherichia coli*, MreB and FtsZ direct the synthesis of lateral cell wall via independent pathways that require PBP 2. *J Bacteriol*.
- [179] P. Vats and L. Rothfield (2007) Duplication and segregation of the actin (MreB) cytoskeleton during the prokaryotic cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104:17795–800.
- [180] S. Vaughan, B. Wickstead, K. Gull, and S. G. Addinall (2004) Molecular evolution of FtsZ protein sequences encoded within the genomes of archaea, bacteria, and eukaryota. *J Mol Evol*, 58:19–29.
- [181] K. Venkateswaran, D. P. Moser, M. E. Dollhopf, D. P. Lies, D. A. Saffarini, B. J. MacGregor, D. B. Ringelberg, D. C. White, M. Nishijima, H. Sano, J. Burghardt, E. Stackebrandt, and K. H. Nealson (1999) Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 49 Pt 2:705–24.
- [182] W. Vollmer (2009) Das dynamische Exoskelett der Bakterien. *BIOspektrum*, 3:248–252.
- [183] W. Vollmer, D. Blanot, and M. A. de Pedro (2008) Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev*, 32:149–67.
- [184] M. Wachi, M. Doi, Y. Okada, and M. Matsushashi (1989) New *mre* genes *mreC* and *mreD*, responsible for formation of the rod shape of *Escherichia coli* cells. *J Bacteriol*, 171:6511–6.
- [185] J. K. Wagner, C. D. Galvani, and Y. V. Brun (2005) *Caulobacter crescentus* requires RodA and MreB for stalk synthesis and prevention of ectopic pole formation. *J Bacteriol*, 187:544–53.
- [186] J. K. Wagner, S. Setayeshgar, L. A. Sharon, J. P. Reilly, and Y. V. Brun (2006) A nutrient uptake role for bacterial cell envelope extensions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103:11772–7.

- [187] B. L. Wanner (1996) Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger, editors, *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, volume 1. ASM Press, Washington D. C., 2nd edition.
- [188] C. Weibull (1953) The isolation of protoplasts from *Bacillus megaterium* by controlled treatment with lysozyme. *J Bacteriol*, 66:688–95.
- [189] W. Weidel and H. Pelzer (1964) Bagshaped Macromolecules - a New Outlook on Bacterial Cell Walls. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 26:193–232.
- [190] L. West, D. Yang, and C. Stephens (2002) Use of the *Caulobacter crescentus* genome sequence to develop a method for systematic genetic mapping. *J Bacteriol*, 184:2155–66.
- [191] R. T. Wheeler and L. Shapiro (1999) Differential localization of two histidine kinases controlling bacterial cell differentiation. *Mol Cell*, 4:683–94.
- [192] C. L. White, A. Kitich, and J. W. Gober (2010) Positioning cell wall synthetic complexes by the bacterial morphogenetic proteins MreB and MreD. *Mol Microbiol*.
- [193] S. P. Wilkinson and A. Grove (2006) Ligand-responsive transcriptional regulation by members of the MarR family of winged helix proteins. *Curr Issues Mol Biol*, 8:51–62.
- [194] M. P. Williamson (1994) The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem J*, 297 ( Pt 2):249–60.
- [195] L. J. Wu and J. Errington (2003) RacA and the Soj-Spo0J system combine to effect polar chromosome segregation in sporulating *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 49:1463–75.
- [196] S. S. Wu, J. Wu, and D. Kaiser (1997) The *Myxococcus xanthus pilT* locus is required for social gliding motility although pili are still produced. *Mol Microbiol*, 23:109–21.
- [197] P. Youderian, N. Burke, D. J. White, and P. L. Hartzell (2003) Identification of genes required for adventurous gliding motility in *Myxococcus xanthus* with the transposable element mariner. *Mol Microbiol*, 49:555–70.
- [198] P. Youderian and P. L. Hartzell (2006) Transposon insertions of magellan-4 that impair social gliding motility in *Myxococcus xanthus*. *Genetics*, 172:1397–410.
- [199] K. D. Young (2006) The selective value of bacterial shape. *Microbiol Mol Biol Rev*, 70:660–703.



# Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Eine Frage der Form:  
Mechanismen morphologischer Differenzierung in Bakterien“

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 29. Juni 2010

---

Juliane Kühn